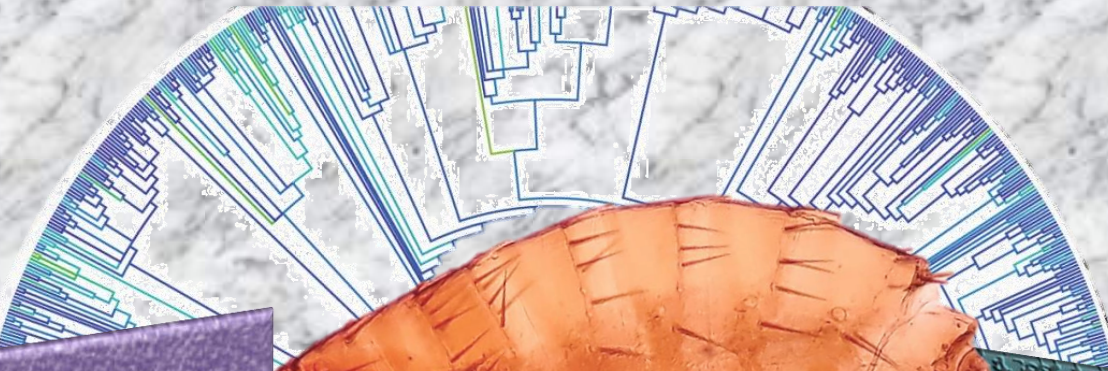


TAXONOMÍA, FILOGENIA Y PAPEL VECTORIAL DE ESPECIES DEL ORDEN SIPHONAPTERA



Antonio Zurita Carrasco – Abril 2018

FACULTAD
DE
FARMACIA



UNIVERSIDAD
DE
SEVILLA

TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TAXONOMÍA, FILOGENIA Y PAPEL VECTORIAL DE ESPECIES DEL ORDEN SIPHONAPTERA

por

ANTONIO ZURITA CARRASCO

dirigida por

Dra. Dña. Cristina Cutillas Barrios

Catedrática del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

Dr. D. Manuel de Rojas Álvarez

Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

Dra. Dña. Rocío Callejón Fernández

Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

Sevilla, 2018

Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctor en Farmacia.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antonio Zurita Carrasco', with a large, sweeping flourish extending from the bottom left.

Fdo.: Antonio Zurita Carrasco



Facultad de Farmacia
Dpto. de Microbiología y Parasitología
c/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla

MIGUEL ÁNGEL CAVIEDES FORMENTO, Profesor Titular y Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, por la presente:

CERTIFICO: Que la Tesis Doctoral titulada **“Taxonomía, filogenia y papel vectorial de especies del Orden Siphonaptera”** presentada por el Lcdo. ANTONIO ZURITA CARRASCO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Dres. Dña. CRISTINA CUTILLAS BARRIOS, D. MANUEL DE ROJAS ÁLVAREZ y Dña. ROCÍO CALLEJÓN FERNÁNDEZ, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide y se firma el presente certificado en Sevilla, a 26 de Enero de 2018.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA
Facultad de Farmacia
Miguel Ángel Caviedes Formento

Fdo.: Miguel Ángel Caviedes Formento



Facultad de Farmacia
Dpto. de Microbiología y Parasitología
c/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla

CRISTINA CUTILLAS BARRIOS Catedrática del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, **MANUEL DE ROJAS ÁLVAREZ** Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla y **ROCÍO CALLEJÓN FERNÁNDEZ** Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada **“Taxonomía, filogenia y papel vectorial de especies del Orden Siphonaptera”** presentada por el Lcdo. ANTONIO ZURITA CARRASCO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide y se firma el presente certificado en Sevilla, a 26 de Enero de 2018.

Fdo.: Manuel de Rojas Álvarez

Fdo.: Cristina Cutillas Barrios

Fdo.: Rocío Callejón Fernández

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas deseo manifestar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que me han ayudado y apoyado directa e indirectamente en la realización de la presente Tesis Doctoral, y sin las cuales nunca habría sido posible conseguir esta meta, en especial:

*A mi directora la **Dra. Dña Cristina Cutillas Barrios** por acogerme en su grupo de investigación, inculcarme todos sus conocimientos científicos, por hacer brotar en mi el gusanillo de la investigación, por aumentar mis inquietudes y conocimientos en el campo de la Parasitología, por ayudar de manera incansable en mi formación como investigador, docente y persona, por enseñarme a valorar el esfuerzo y que sin esfuerzo no hay recompensa, por aconsejarme y ayudarme a superar numerosas adversidades, por otorgarme el honor de trabajar a su lado, por las incontables horas que me ha dedicado, por confiar y apostar por mi en numerosas ocasiones, por tratarme como familia, por ser exigente conmigo pero cariñosa, amable y justa a la vez y sobre todo y más importante por demostrarme a diario su valiosa amistad.*

*A mi director el **Dr. D. Manuel de Rojas Álvarez** por introducirme en el Departamento de Microbiología y Parasitología brindándome la oportunidad de conocer a maravillosos profesionales y personas. Por confiar en mi desde el primer momento, por ayudarme en innumerables ocasiones, por animarme a continuar a pesar de los obstáculos, por su cariño y comprensión, por todo el tiempo que me ha dedicado, por su generosidad, por inculcarme numerosos conocimientos relacionados con el mundo de la investigación y en especial de la Parasitología y por supuesto por su amistad.*

*A mi directora la **Dra. Dña. Rocío Callejón Fernández** por el cariño, amabilidad y generosidad demostrados desde el primer día que nos conocimos. Por ayudarme a aumentar de manera exponencial mis aptitudes investigadoras y docentes, por estar siempre dispuesta a echarme una mano, por hacerme reír cuando lo he necesitado, por aguantar tantas y tantas conversaciones sobre fútbol, por alentarme y apoyarme en todo momento, por dedicarme numerosas horas de trabajo, por tener siempre buenas palabras y nunca un mal gesto, por hacerme*

mejor persona, y lo más importante, por demostrarme que su amistad va mas allá del mundo laboral.

*Al **Dr. D. Jose Manuel Úbeda Ontiveros** por sus sabios consejos, por su amabilidad en todo momento y por haber contribuido a la mejora de mi formación profesional.*

*A la **Dra. Dña. Concepción Ariza Astolfi** por su cariño, por sus consejos, por hacerme ver siempre el lado positivo de las cosas y por animarme en todo momento.*

*A **D. Miguel Fernández Almenara** por su disponibilidad y ayuda desinteresada.*

*Al Departamento de Microbiología y Parasitología por permitirme desarrollar mi trabajo en sus instalaciones. Agradecer especialmente en este apartado al ex director del Departamento **D. Antonio Ventosa Ucero** y al actual director **D. Miguel Ángel Caviedes Formento** por la ayuda brindada en numerosas ocasiones, por darme siempre facilidades para desarrollar mi trabajo y por su trato cercano y cariñoso.*

*A **M^a del Mar Barcia** y **Pedro J. Vivar** por su inestimable ayuda con tantos y tantos problemas burocráticos.*

*A los que fueron o son mis compañeros del área de Microbiología **D. Rafael Ruiz, Dña. Cristina Sánchez-Porro, Dña. Maria José León, Dña. Ana Durán, Dña. Clara López, Dña. Blanca Vera** y **D. Ali Tahrioui** por su inestimable ayuda en todo momento y por compartir a partes iguales conocimientos, trabajo, inquietudes, preocupaciones, risas y cervezas.*

*A la **Dra. Marcela Lareschi** por concederme la oportunidad de trabajar a su lado aportándome innumerables conocimientos científicos y muy especialmente a la **Dra. M^a del Rosario Robles, Mara Urdapilleta** y **Francisco Benavides (Panchito)** por brindarme su amistad y hacer que mi estancia en la ciudad de La Plata (Argentina) haya sido una de las mejores experiencias de mi vida.*

*Al **Dr. Phillipe Parola** por aceptarme en su prestigioso centro de investigación aportándome valiosos conocimientos para mi carrera investigadora. También*

*agradecer de manera especial a **Cristina Ortega, Nayef Charafeddine y Maureen Laroche** la amistad y generosidad demostrada durante mi estancia en Marsella, los buenos momentos compartidos, y sobre todo la ayuda desinteresada que recibí por su parte en todo momento.*

*A mis ex compañeros de licenciatura y Máster pero sobre todo amigos, **Ismael Vázquez, Abraham Pedregal, Manuel Murillo, Antonio Pereira, Pilar Corraliza, Rocio del Santo y Pablo del Cerro** por convertir esta carrera de fondo en una maravillosa experiencia, por ayudarme tantas y tantas veces, por brindarme tantos buenos momentos y por supuesto por su valiosa amistad.*

*A la que dicen es la familia que uno escoge durante su vida, MIS AMIGOS, **Alejandro Díaz, David Suárez, Daniel Olivera, Francisco Manuel Zurita, Francisco Bernal, Pedro Sánchez, Pedro Muñoz, Francisco Benítez y Curro Quintero** por estar siempre ahí, por sacarme tantas y tantas sonrisas, por apoyarme en todo momento, por saber que puedo contar con ellos, por hacerme infinidad de favores, por ayudarme en los muestreos como solo ellos saben hacerlo y por ser una importantísima parte de mi vida. GRACIAS CHAVALES.*

*A todos los familiares, incluida mi familia política, que me han apoyado y ayudado de uno u otro modo a conseguir mi objetivo. Especialmente a mi tito **Joaquín** y mi tita **Toñi** por sus consejos, por su cariño y por demostrarme que puedo contar con ellos siempre.*

*A mi hermana **María** por las numerosas horas que hemos compartido durante tantísimos años, por ser una grandísima consejera, por alentarme siempre a conseguir mis metas, por su ayuda incansable y por hacerme sentir el hermano mas querido del mundo.*

*A mis abuelas **María y Carmen** por todo el amor y cariño regalado durante tantos años y por enseñarme el significado de la palabra bondad.*

*A mi abuelo **D. José Carrasco Romero** por ser un ejemplo para mí, por enseñarme que el trabajo constante tiene sus frutos y porque no hay mayor satisfacción tras tanto trabajo realizado que saber que estás orgulloso de mí.*

*A la mitad de mi vida desde hace casi siete años, **María Marín González**. Por creer siempre en mí, por hacerme mejor persona, por no abandonarme nunca, por su gran paciencia, por levantarme en los malos momentos, por hacerme ver cada día que soy afortunado, por hacer que nunca pierda la ilusión, por ser tan maravillosa y sobre todo por darme tanto y tanto amor. **TE QUIERO**.*

*Por último mi agradecimiento a quienes mas debo, mis padres **Antonio** y **María Jesús**. Por haberme dado una maravillosa educación, por inculcarme innumerables valores, por saber que os tendré siempre que os necesite, por enseñarme lo que es querer a alguien incondicionalmente, por hacerme sentir el hijo mas afortunado de la Tierra, por haber sido pacientes conmigo y porque para agradecerlos todo lo que os debo necesitaria una Tesis Doctoral entera. Llegar hasta aquí nunca habría sido posible sin vosotros. **OS QUIERO**.*

GRACIAS

A mi abuelo José

La vida es una obra de teatro que no permite ensayos... Por eso, canta, ríe, baila, llora y vive intensamente cada momento de tu vida... Antes que el telón baje y la obra termine sin aplausos.

Charles Chaplin

ÍNDICE

INDICE _____	1
Índice de figuras _____	5
Índice de tablas _____	7
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES _____	8
I.1. PHYLUM ARTHROPODA. CLASE INSECTA _____	9
I.1.1. Características generales de los artrópodos _____	9
I.1.2. Características generales de los insectos _____	10
I.1.3. Taxonomía de los insectos en base a estudios morfológicos y biométricos _____	11
I.1.4. Estudios filogenéticos de los insectos holometábolos basados en técnicas moleculares _____	13
I.1.5. Utilización de la técnica MALDI-TOF MS en insectos _____	16
I.2. ORDEN SIPHONAPTERA _____	18
I.2.1. Morfología _____	18
I.2.2. Ciclo biológico _____	28
I.2.3. Epidemiología e importancia sanitaria _____	31
I.2.3.1. Importancia de las pulgas como ectoparásitos _____	32
I.2.3.2. Pulgas como vectores de enfermedades _____	33
I.2.3.3. Pulgas como hospedadores intermediarios de helmintos _____	40
I.2.4. Taxonomía del Orden Siphonaptera _____	41
I.2.4.1. Ancestro y grupo hermano _____	41
I.2.4.2. Taxonomía del Orden Siphonaptera en base a criterios morfológicos _____	43
I.2.4.3. Taxonomía del Orden Siphonaptera en base a estudios moleculares _____	46
I.2.5. Uso de la técnica MALDI-TOF MS en el Orden Siphonaptera _____	48
I.2.6. Prevención y control _____	49
I.3. BIBLIOGRAFÍA _____	51
CAPÍTULO II. OBJETIVOS _____	63
II.1. GENERALES _____	64
II.2. ESPECÍFICOS _____	64
CAPÍTULO III. RESULTADOS _____	66
III.1. TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE DIVERSAS ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA: ESTUDIOS MORFOLÓGICOS, BIOMÉTRICOS Y MOLECULARES _____	67
III.1.1. <i>Stenoponia tripectinata</i> (Zurita y col., 2015) _____	67
III.1.2. <i>Ctenocephalides felis</i> y <i>Ctenocephalides canis</i> (Zurita y col., 2016a) _____	70
III.1.3. <i>Nosopsyllus barbarus</i> y <i>Nosopsyllus fasciatus</i> (Zurita y col., 2018a) _____	74

III.1.4. <i>Archaeopsylla erinacei</i> (Zurita y col., 2018b)	76
III.1.5. <i>Pulex irritans</i>	80
III.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN DISTINTAS ESPECIES DE SIFONÁPTEROS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES (Zurita y col., 2016b)	84
III.3. IDENTIFICACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA Y POSIBLES BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A ELLAS MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA MALDI-TOF MS	86
III.4. PUBLICACIONES	89
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	249
IV.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS, BIOMÉTRICOS, MOLECULARES Y FILOGENÉTICOS DE DIFERENTES ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA	250
IV.1.1. <i>Stenoponia tripectinata</i> (Zurita y col., 2015)	250
IV.1.2. <i>Ctenocephalides felis</i> y <i>Ctenocephalides canis</i> (Zurita y col., 2016a)	252
IV.1.3. <i>Nosopsyllus barbarus</i> y <i>Nosopsyllus fasciatus</i> (Zurita y col., 2018a)	256
IV.1.4. <i>Archaeopsylla erinacei</i> (Zurita y col., 2018b)	260
IV.1.5. <i>Pulex irritans</i>	264
IV.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN DISTINTAS ESPECIES DE SIFONÁPTEROS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES (Zurita y col., 2016b)	269
IV.3. IDENTIFICACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA Y POSIBLES BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A ELLAS MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA MALDI-TOF MS	275
IV.4. BIBLIOGRAFÍA	279
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	292
V.1. CONCLUSIONES GENERALES	293
V.2. CONCLUSIONES SOBRE TAXONOMÍA CLÁSICA	293
V.3. CONCLUSIONES BASADAS EN LA TAXONOMÍA MOLECULAR Y FILOGENIA	294
V.4. CONCLUSIONES EPIDEMIOLÓGICAS	295
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONS	297
VI.1. GENERAL CONCLUSIONS	298
VI.2. CLASSIC TAXONOMIC CONCLUSIONS	299
VI.3. CONCLUSIONS BASED ON MOLECULAR TAXONOMY AND PHYLOGENY	299
VI.4. EPIDEMIOLOGICAL CONCLUSIONS	300

ANEXO I. MATERIAL Y MÉTODOS	302
A.I.1. MATERIAL	303
A.I.1.1. Recogida del material	304
A.I.2. MÉTODOS	306
A.I.2.1. Estudios biométricos y morfológicos de distintas especies pertenecientes al Orden Siphonaptera	306
A.I.2.2. Estudios moleculares y filogenéticos de distintas especies pertenecientes al Orden Siphonaptera	308
A.I.2.2.1. Selección de marcadores moleculares	308
A.I.2.2.2. Extracción de ADN	308
A.I.2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	310
A.I.2.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	310
A.I.2.2.5. Purificación y cuantificación del ADN amplificado	314
A.I.2.2.6. Secuenciación	316
A.I.2.2.7. Clonación y transformación del ADN amplificado	320
A.I.2.2.8. Análisis de las secuencias	327
A.I.2.2.9. Análisis filogenéticos	329
A.I.2.3. Análisis basados en la técnica MALDI-TOF MS	338
A.I.2.4. Detección de patógenos en las especies de sifonápteros estudiadas mediante técnicas moleculares	340
A.I.3. BIBLIOGRAFÍA	343

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Figura 1: Hembra adulta de la especie *Pulex irritans*. C: Cabeza; TX: Tórax; AB: Abdomen _____ 19
- Figura 2:** Figura 2I: Cabeza de una hembra adulta de la especie *Nosopsyllus barbarus*. La flecha señala la clava antenal. Figura 2II: La flecha señala el tubérculo frontal presente en un macho de la especie *N. barbarus* _____ 20
- Figura 3:** 3I: Cabeza de una hembra adulta de la especie *Ctenocephalides felis*. A: Peine genal; B: Ojo; C: Sutura antenal. Figura 3II: Piezas bucales. A: Palpos maxilares; B: Palpos labiales; C: Epifaringe; D: Maxilas; E: Lacinias _____ 21
- Figura 4:** Tórax de un sifonáptero de la especie *N. barbarus*. PR: Protórax; MS: Mesotórax; MT: Metatórax. La flecha señala el peine pronotal _____ 22
- Figura 5:** 5I: Patas de un macho adulto de la especie *P. irritans*. A: Coxa; B: Trocanter; C: Fémur; D: Tibia; E: Tarso. Figura 5II: La flecha señala las uñas del distitarsómero _____ 23
- Figura 6:** Figura 6: Esquema de la morfología general cuerpo de una hembra adulta de la especie *N. fasciatus*. T: Tergitos abdominales; E: Esternitos abdominales; S: Sensilium _____ 24
- Figura 7:** Genitalia de un macho de *P. irritans*. A: Aedeagus; EIX: Esternito IX; P1: Parte fija del clasper (Basímero); P2: Parte móvil del clasper (telómero) _____ 26
- Figura 8:** Espermateca de una hembra de *P. irritans*. B: Bulga; H: Hilla _____ 27
- Figura 9:** Esquema del ciclo biológico de los sifonápteros _____ 30
- Figura 10:** Lesiones típicas provocadas por picaduras de sifonápteros _____ 32

Figura 11: Cápsulas ovígeras de <i>Dipylidium caninum</i>	40
Figura 12: Distribución geográfica y hospedadores de <i>S. tripectinata</i>	67
Figura 13: Figura 13: Esquema de las zonas geográficas muestreadas para las especies <i>C. felis</i> y <i>C. canis</i>	73
Figura 14: Distribución geográfica y hospedadores de <i>N. fasciatus</i> y <i>N. barbarus</i>	75
Figura 15: Esquema de los resultados obtenidos para la especie <i>A. erinacei</i>	77
Figura 16: Esquema de las zonas geográficas muestreadas para la especie <i>P. irritans</i>	81
Figura 17: Espectros obtenidos para la especie <i>P. irritans</i> mediante el uso de la técnica MALDI-TOF MS	87
Figura 18: Esquema del procedimiento de extracción de ADN según el protocolo <i>DNeasy® Blood & Tissue Handbook</i> de QIAGEN	310
Figura 19. Vector <i>pGEM®-T Easy</i>	321

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de las especies de sifonápteros estudiadas en la presente Tesis Doctoral por especie hospedadora y zona geográfica_	303
Tabla 2: Mezcla de reactivos, cebadores y condiciones de PCR utilizados para cada marcador molecular estudiado en la presente Tesis Doctoral_____	313
Tabla 3: Secuencias y números de acceso (GenBank) obtenidos para los diferentes marcadores moleculares de pulgas estudiados en la presente Tesis Doctoral_____	317
Tabla 4: Números de acceso (GenBank) de las secuencias de patógenos detectados molecularmente en distintas especies de sifonápteros en la presente Tesis Doctoral_____	319
Tabla 5: Reactivos y volumen usados en la reacción de Ligación_____	322
Tabla 6: Reactivos utilizados para la liberación del inserto con el enzima de restricción <i>EcoR1</i> _____	327
Tabla 7: Número de acceso, longitud de la secuencia, gen o región amplificada y hospedador de los taxones utilizados para la reconstrucción de los árboles filogenéticos presentados en la presente Tesis Doctoral_____	329
Tabla 8: Gen diana y referencias de cebadores y sondas utilizadas para la detección molecular de los distintos patógenos estudiados en la presente Tesis Doctoral_____	342



CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I.1. PHYLUM ARTHROPODA. CLASE INSECTA

I.1.1. Características generales de los artrópodos

Los artrópodos (Arthropoda, del griego ἄρθρον, árthron, «articulación» y πούς, poús, «pie») constituyen el Phylum más numeroso y diverso del reino animal. Así, más del 85 % de las especies animales conocidas son artrópodos y se estima que pueden existir más de 30 millones de especies (Soulsby, 1982). Los miembros de este Phylum han colonizado prácticamente todos los hábitats, desde suelos oceánicos hasta enormes altitudes, lo que explica su extraordinaria diversidad morfológica, taxonómica y biológica (Aburame, 2009). Los artrópodos son animales metazoos con simetría bilateral y celomados (poseen celoma). Presentan el cuerpo metamerizado, es decir, el cuerpo está dividido en metámeros o unidades corporales que se repiten a lo largo del eje longitudinal del animal. Además, están provistos de un exoesqueleto quitinoso que los protege y presentan apéndices articulados tanto si son ambulatorios como de carácter alimenticio o reproductor. Los artrópodos se clasifican en dos grandes grupos: quelicerados y mandibulados. En el primero, se incluye la Clase Arachnida donde se localizan numerosas especies de gran importancia económica y sanitaria para el hombre. Entre los mandibulados, la Clase Insecta es la de mayor trascendencia socio-sanitaria para el ser humano, englobando a más del 90 % del total de los artrópodos conocidos hasta la fecha.

A los artrópodos se les considera el grupo de mayor riesgo potencial para la salud humana no sólo por el elevado número de especies que incluye o la amplia distribución de las mismas sino sobre todo por la capacidad de constituirse en vectores de enfermedades humanas y de animales domésticos. Entre estas enfermedades cabe

destacar algunas tan trascendentes como el dengue, leishmaniosis, peste bubónica, enfermedad de Chagas, paludismo o tifus murino. Además de su capacidad vectorial, los artrópodos pueden ser agentes etiológicos de enfermedades como la tungiasis, la cimiasis o la pediculosis entre otras, además de provocar alteraciones como consecuencia de su capacidad toxicogénica.

I.1.2. Características generales de los insectos

La Clase Insecta constituye el grupo de artrópodos más numeroso (70 % del total de las especies animales conocidas) y con una mayor importancia económica y sanitaria para el ser humano. Los insectos son fácilmente distinguibles de otros artrópodos ya que presentan el cuerpo dividido en tres unidades funcionales bien diferenciadas (cabeza, tórax y abdomen) y todos los adultos presentan tres pares de patas más o menos desarrolladas que se insertan en el tórax. Además, todos poseen un sistema respiratorio basado en un sistema de tráqueas y estigmas respiratorios, un aparato digestivo más o menos desarrollado y un sencillo sistema nervioso y vascular (Soulsby, 1982). Algunos aspectos de su biología tales como la presencia de un exoesqueleto, el desarrollo de alas para el vuelo o la existencia de procesos de metamorfosis durante su ciclo de vida, han sido los responsables de su éxito evolutivo durante millones de años. Los insectos holometábolos constituyen el grupo de insectos más numeroso dentro de la Clase Insecta. La característica principal y para muchos la causa fundamental del inigualable éxito evolutivo de los insectos holometábolos es que presentan una metamorfosis completa. Este tipo de metamorfosis se caracteriza por presentar un estado de pupa, que no se alimenta activamente, entre la fase larvaria y la fase adulta. En la actualidad se conocen, aproximadamente, 800.000 especies (Grimaldi y Engel, 2005) e incluso algunos estudios llevados a cabo en la zona central y sur de África han revelado la

posibilidad de que millones de especies de insectos holometábolos estén aún por descubrir (Pape y col., 2009).

Los Órdenes más estudiados en los últimos años dentro de este grupo de insectos han sido el Orden Coleoptera (escarabajos), Diptera (mosquitos y moscas), Lepidoptera (polillas y mariposas), Hymenoptera (abejas, avispas y ciertos grupos de hormigas) y Siphonaptera (pulgas). Todo ello debido a la importancia médica y económica que tienen para el ser humano como consecuencia de su papel como vectores de enfermedades.

I.1.3. Taxonomía de los insectos en base a estudios morfológicos y biométricos

La morfología y la biometría son actualmente consideradas el soporte principal de la identificación y la taxonomía de los insectos. Hay que tener en cuenta que la morfología general externa de un insecto aporta la fuente más inmediata y evidente de comparación entre especies, mientras que el estudio de la morfología interna incluyendo la genitalia, musculatura, órganos y glándulas también aporta un número de caracteres útiles adicionales (Lane y Crosskey, 1993).

La taxonomía de los insectos ha sido motivo de debate desde hace siglos (milenios si incluimos a Aristóteles). Así, muchos de los caracteres morfológicos usados para su clasificación y muchos de los grupos taxonómicos reconocidos hoy en día, tienen su origen en trabajos que poseen cientos de años de antigüedad (Wheeler y col., 2001). Aristóteles propuso la primera división de insectos entre alados (Pterygota) y no alados (Apterigota). Este criterio taxonómico ha sido mantenido durante cientos de años por diversos autores como Aldrovandus (1602) quien incorporó la relación hábitat-insecto ó Ray (1710) y Linnaeus (1735, 1738) quienes utilizaron por primera vez el término metamorfosis para referirse al ciclo de vida de los insectos. Esta clasificación

en dos grandes Subclases se sigue manteniendo actualmente. Sin embargo, numerosos trabajos han puesto de manifiesto su escaso valor taxonómico al considerarse agrupaciones parafiléticas (Wheeler y col., 2001).

El grupo que forman los insectos holometábolos está considerado como el más exitoso y diverso de todos los organismos terrestres. Por ello, no es de extrañar que dentro de este grupo se encuentren más del 80 % de las especies de insectos y más del 50 % de las especies animales (Kristensen, 1999). Los insectos holometábolos han sido considerados como grupo monofilético desde hace relativamente poco tiempo. Henning (1969) fue el primero en citar a este grupo y posteriormente Hamilton (1972) y Kristensen (1975, 1981) aportaron diversas revisiones taxonómicas de este grupo de insectos. Hoy en día, la clasificación básica que se mantiene es la propuesta por Hening (1981) que incluye 11 Órdenes: Neuroptera, Megaloptera, Raphidioptera, Coleoptera, Strepsiptera, Hymenoptera, Diptera, Siphonaptera, Mecoptera, Lepidoptera y Trichoptera. De ellos, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera y Lepidoptera contienen más del 99 % de la diversidad del grupo. La monofilia de cada Orden de insectos se encuentra relativamente bien apoyada por datos morfológicos (Kristensen, 1999; Whiting y col., 1997) con la excepción del Orden Mecoptera, que parece ser parafilético con Siphonaptera (Whiting, 2002a, b). Hay que destacar que la aparición de análisis cladísticos y sobre todo de las técnicas moleculares en los últimos 30 años ha supuesto que esta clasificación sea discutida; sin embargo, aún permanece como la más fiable desde un punto de vista taxonómico clásico.

La sistemática de insectos tiene una larga y rica historia a la hora de usar datos morfológicos y biométricos como la fuente primaria de información para llevar a cabo inferencias filogenéticas (Ross, 1973). Quizás esto sea fruto del alto nivel de diversidad morfológica existente dentro de este grupo de artrópodos. Así, aunque los análisis

filogenéticos aplicados a la taxonomía de insectos basados en datos moleculares, están tomando un mayor protagonismo en los últimos años sobre la taxonomía de insectos, éstos necesitan apoyarse en datos morfológicos y biométricos si queremos llegar a dilucidar de manera completa la complicada taxonomía de este grupo de artrópodos (Bybee y col., 2010). Por todo ello, la taxonomía clásica continúa jugando un papel fundamental en la era post-genómica de la sistemática de insectos. Además de proporcionar un conjunto de datos independientes para una evaluación crítica de la filogenia molecular (y viceversa), la sistemática morfológica es la base para reconstruir complejos escenarios evolutivos basados en cambios a nivel fenotípico. Hoy en día, en concordancia con datos filogenómicos, el estudio morfológico ofrece no solo una fuente adicional de datos, sino también una estimación filogenética independiente que permite evaluar relaciones evolutivas a la vez que resuelve la situación de ciertos taxones fósiles (Trautwein y col., 2012). Del mismo modo, estudios ontogénicos como los de Machida (2006) junto con investigaciones ultraestructurales detalladas como las de Dallai (2009) y las nuevas técnicas de visualización como la tomografía microcomputerizada (micro-CT) combinados con reconstrucciones en tres dimensiones, han revolucionado la anatomía de los insectos, permitiéndonos de este modo, evaluar una mayor variedad de caracteres taxonómicos con el fin de dilucidar el complejo mosaico que representa la evolución de los insectos.

I.1.4. Estudios filogenéticos de los insectos holometábolos basados en técnicas moleculares

La aplicación de técnicas moleculares para la resolución de una gran variedad de problemas ha supuesto uno de los cambios más importantes en las ciencias biológicas en los últimos veinte años. La aplicación de las técnicas moleculares a la resolución de problemas filogenéticos ha tenido gran trascendencia en las clasificaciones

taxonómicas, en el modo de interpretar procesos evolutivos, en el estudio de las vías de dispersión de distintos organismos (filogeografía) y en la estimación de edades geológicas mediante relojes moleculares.

El principal argumento a favor de la utilización de los caracteres moleculares para establecer relaciones filogenéticas es que son universales. En muchos casos, principalmente cuando se requieren comparar linajes con divergencia temprana, es imposible establecer hipótesis de homología morfológica. En cambio, existen genes presentes en todos los organismos que pueden aportar información para reconstrucciones filogenéticas donde los caracteres morfológicos no son útiles (Avice, 1994).

Un método rápido y relativamente fácil de llevar a cabo cambió la forma en que se realiza el análisis del ADN: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, 1988; Mullis y col., 1992). Este método no sólo puede ser usado para la selección y aislamiento de regiones concretas de ADN, sino que los productos obtenidos tras la amplificación de regiones concretas de ADN pueden ser también secuenciadas.

La técnica PCR ha sido ampliamente utilizada en diferentes tipos de estudios. Así, la información genética obtenida con esta metodología se ha podido aplicar a la identificación de especies morfológicamente muy parecidas, a la identificación de poblaciones, a los estudios taxonómicos y epidemiológicos y al diseño de métodos diagnósticos para distintos grupos de organismos (Mora, 2005).

Dado que la morfología nos ha guiado hacia una filogenia bastante ambigua dentro de la diversidad de la Clase Insecta, no sorprende que en los últimos treinta años la mayoría de los estudios se hayan realizado utilizando secuencias de ADN como diana principal a la hora de establecer relaciones filogenéticas entre los distintos Órdenes de

insectos holometábolos. Así, estos estudios han sido posible gracias al gran desarrollo de las técnicas moleculares, especialmente las basadas en el ADN (secuenciación, amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), microsátélites) aunque también las que estudian otros tipos de moléculas (isoenzimas o hidrocarburos cuticulares).

De la literatura consultada se deducen numerosas hipótesis filogenéticas para los insectos holometábolos basadas en caracteres morfológicos filogenéticamente informativos hasta que Whiting y col. (1997) publicaron el primer estudio cuantitativo de este grupo basado tanto en caracteres morfológicos clásicos como en datos moleculares. En concreto, el uso de la amplificación mediante la técnica de PCR de secuencias del ADN ribosómico y mitocondrial se ha llevado a cabo en todos los Órdenes dentro de este grupo. Carmean y col. (1992) secuenciaron un fragmento del gen 18S del ADN ribosómico (ADNr) de 19 taxa que representaban a 6 Órdenes holometábolos. Los análisis publicados por estos autores junto a los realizados por Chalwatzis y col. (1996) sugerían una parafilia para los insectos holometábolos. Por otro lado, Pashley y col. (1993) y Whiting y col. (1997) también usaron el gen 18S ADNr para representar nueve y once Órdenes de insectos holometábolos, respectivamente. Todos estos análisis moleculares coincidían en refrendar la existencia del Superorden Amphiesmenoptera (Lepidoptera y Trichoptera) y la de una estrecha relación entre Mecoptera y Siphonaptera. Además, Whiting y col. (1997) demostraron el carácter monofilético de este grupo situando además a Megaloptera y Raphidioptera como grupos hermanos. Para resolver estas relaciones filogenéticas entre los distintos Órdenes, Whiting (2002a) utilizó el gen 18S ADNr como marcador molecular de referencia. Este autor discutió por primera vez la limitación que supone analizar este gen como único marcador filogenético para reconstruir la historia evolutiva dentro de

los insectos holometábolos, y volvió a considerar Mecoptera y Siphonaptera como grupos hermanos.

Posteriormente, basándose en otros marcadores moleculares y nuevos caracteres morfológicos, Wiegmann y col. (2009), Mckenna y Farrell (2010) y Beutel y col. (2011) retomaron la idea de que Hymenoptera está considerado como grupo hermano del resto de Órdenes, situándolo como el primer linaje de insectos holometábolos establecidos desde el origen de la Clase Insecta, y definieron al Orden Mecoptera como grupo monofilético. Recientemente, estas hipótesis ganaron fuerza con el análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos de genomas completos de algunas especies del Orden Strepsiptera (Niehuis y col., 2012). A pesar de este gran progreso, los datos moleculares publicados hasta ese momento aún eran bastante limitados. Así, Peters y col. (2014) presentó la primera reconstrucción de las relaciones entre insectos holometábolos basada en datos transcriptómicos de individuos representativos de todos los Órdenes reconocidos actualmente, junto con una extensiva gama de datos morfológicos publicados con anterioridad. Además, localizaron las transformaciones a nivel de fenotipia de los distintos Órdenes que conforman los insectos holometábolos con vistas a establecer un plan evolutivo básico dentro de este grupo.

I.1.5. Utilización de la técnica MALDI-TOF MS en insectos

A comienzos del siglo XXI la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo) (MALDI-TOF MS) se comenzó a aplicar para la identificación y filogenia de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y levaduras (Croxatto y col., 2012; Welker y col., 2011). Es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como

proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales. En esta técnica la muestra se mezcla con una matriz orgánica en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas co-cristalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de protones (H⁺) a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas que son analizadas mediante un detector TOF. El TOF de un ión molecular particular se decide por el nivel de ionización, así como su masa molecular. Basado en la información TOF, se genera un espectro característico para una biomolécula dada y constituye su huella digital específica (Singhal y col., 2016). La obtención de espectros permite la creación de una base de datos espectral de referencia que puede utilizarse para identificar especies de manera rápida y reproducible (Yssouf y col., 2014). La popularidad de MALDI-TOF MS se atribuye a la relativa facilidad para la preparación de las muestras, la velocidad con la que se obtienen y analizan los resultados y la alta fiabilidad para la identificación específica que posee. Por otro lado, la relación coste efectividad es bastante competitiva en comparación con la de otras técnicas moleculares. Por todo ello, desde su descubrimiento esta técnica ha sido introducida poco a poco en el análisis rutinario para la identificación de microorganismos en la mayoría de laboratorios de microbiología clínica, estableciéndose como método diagnóstico de referencia (Welker y col., 2011; Seng y col., 2010). En los últimos cinco años la utilidad de la técnica MALDI-TOF MS ha sido evaluada para la identificación de organismos multicelulares como los artrópodos. En este sentido, un estudio pionero en insectos demostró la utilidad de esta técnica para la identificación de insectos del Orden Mantophasmatodea

originario del sur de África (Predel y col., 2005). Tras este estudio, MALDI-TOF MS ha sido aplicado en numerosos grupos taxonómicos de artrópodos como el género *Culicoides* (Kaufmann y col., 2012), garrapatas (Karger y col., 2012), mosquitos (Muller y col., 2013), moscas (Hoppenheit y col., 2013) y pulgas (Yssouf y col., 2014). Recientemente, esta técnica también ha comenzado a utilizarse con fines epidemiológicos, más concretamente en estudios relacionados con la detección de ciertas bacterias patógenas en algunos insectos vectores hematófagos como las garrapatas. En este sentido, Fotso Fotso y col. (2014) puso de manifiesto la posibilidad de detectar la bacteria patógena *Borrelia crocidurae* en la especie de garrapata *Ornithodoros sonrai* mediante el uso de MALDI-TOF MS, mientras que utilizando la misma técnica, Yssouf y col. (2015) fueron capaces de detectar *Rickettsia* sp. en las especies *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor marginatus* mediante la identificación de una serie de picos discriminativos entre los espectros de las muestras infectadas y los espectros de aquéllas que no lo estaban. De este modo, en ambos trabajos se puso de manifiesto la utilidad dual de esta técnica: Identificación de artrópodos a distintos niveles taxonómicos y detección de patógenos de manera rápida y eficaz.

I.2. ORDEN SIPHONAPTERA

I.2.1. Morfología

Los sifonápteros (Siphonaptera, gr. σιφων *siphon*, "canal, tubo" y απτέρα *aptera*, "sin alas"), más comúnmente conocidos como pulgas, son insectos hematófagos obligados de vertebrados de sangre caliente. Carecen de alas y poseen una metamorfosis holometábola o completa. Tienen el cuerpo comprimido lateralmente, con numerosas

setas y un aspecto brillante con colores que van desde el amarillo oscuro hasta casi negro.

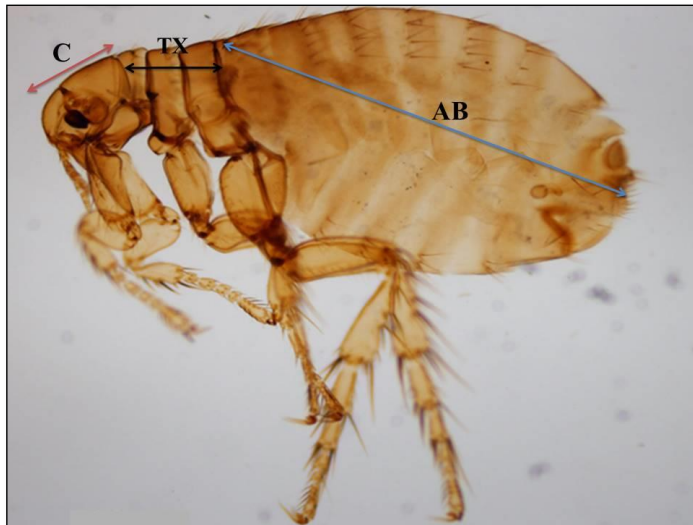


Figura 1: Hembra adulta de la especie *Pulex irritans*. C: Cabeza; TX: Tórax; AB: Abdomen

Como en el resto de insectos, los adultos tienen el cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen (Figura 1). Su tamaño varía entre 1-8 mm y tienen el cuerpo fuertemente esclerotizado. Algunas especies se caracterizan por poseer uno o más grupos de espinas fuertemente esclerotizadas dispuestas en forma de hilera denominados peines o ctenidios. Si esta estructura se localiza en el margen ventral de la cabeza se denomina peine o ctenidio genal mientras que si se encuentra situada en el margen posterior del protórax se denomina peine o ctenidio pronotal. Cabe resaltar que, aunque estos ctenidios cuando están presentes suelen localizarse en estas dos regiones, se han descrito especies que poseen un ctenidio en la parte abdominal o en otras regiones de la cabeza. Aparte de los ctenidios, las pulgas tienen el cuerpo recubierto por una serie de setas y cerdas especializadas que a menudo, junto con la naturaleza de los ctenidios, reflejan el tipo de hospedador al que parasitan y especialmente cuando se trata de pulgas específicas de un solo tipo de hospedador (Durden y Traub, 2002). De hecho,

la presencia y distribución de las espinas y sedas junto con la forma de la cabeza y la extraordinariamente compleja genitalia que poseen los sifonápteros, constituyen los caracteres morfológicos más usados a la hora de establecer relaciones taxonómicas a distintos niveles (Whiting, 2008).

Cabeza

La parte anterior de la cabeza posee un frontal o clípeo que puede encontrarse separado de la zona posterior (occipital u occipicio) por la sutura antenal que se extiende hasta la antena, que está insertada en un surco antenal (Figura 2I). En la parte anterior del frontal puede presentarse un tubérculo denominado tubérculo frontal (Figura 2II). Las antenas están compuestas por tres segmentos: Escapo, pedicelo y flagelo, este último también denominado clava (Figura 2I). La clava se divide a su vez en varios segmentos denominados flagelómeros. En algunas especies la sutura antenal no es completa, siendo sólo un vestigio representado por una región más esclerotizada en la parte superior (Figura 3I).



Figura 2. 2I: Cabeza de una hembra adulta de la especie *Nosopsyllus barbarus*. La flecha señala la clava antenal. Figura 2II: La flecha señala el tubérculo frontal presente en un macho de la especie *N. barbarus*.

Otras veces, en el borde dorsal del occipital, puede presentarse un surco denominado surco occipital. La quetotaxia de la región occipital es de una gran

importancia en la sistemática del grupo. Los ojos pueden estar presentes o ausentes, a veces incluso reducidos a una especie de mancha ocular, pudiendo estar pigmentados o no. La parte inferior de la cabeza, gena, puede o no estar protegida por un ctenidio genal (Figura 3I), que a veces es vestigial. En la familia Stephanocircidae la región frontal también presenta un ctenidio que se denomina ctenidio frontal. Las piezas bucales están constituidas por un par de maxilas, un par de palpos labiales, un par de palpos maxilares y tres estiletos muy finos (dos lacinias y la epifaringe) (Figura 3II). Los palpos labiales no se encuentran quitinizados y se encuentran divididos en un número variable de regiones (entre 2 y 17), mientras que los palpos maxilares se encuentran en una posición posterior a los labiales y están quitinizados y divididos en cuatro regiones invariables. Por último, aparecen unos orificios con aspecto de puntos de implantación de setas que se localizan en la parte anterior y posterior de la cabeza y que se les conoce con el nombre de lucodiscos. Se cree que poseen una función sensorial, aunque no se ha demostrado (Linardi y Guimarães, 2000).

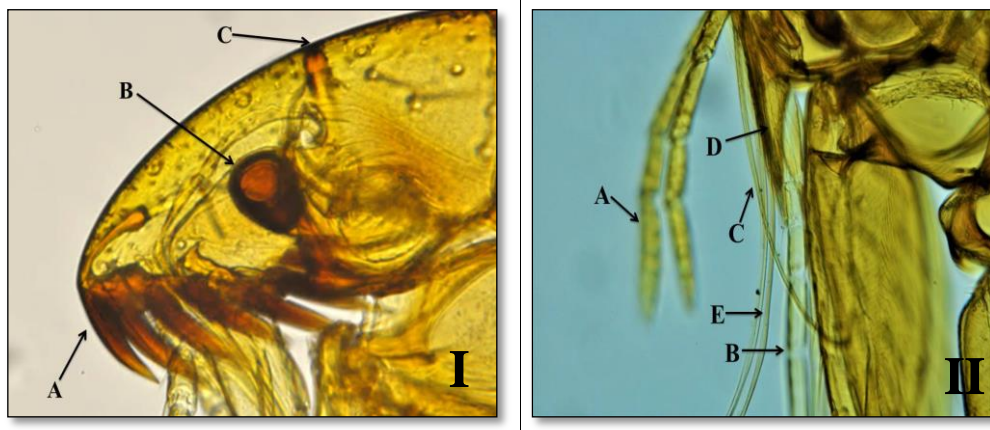


Figura 3. 3I: Cabeza de una hembra adulta de la especie *Ctenocephalides felis*. A: Peine genal; B: Ojo; C: Sutura antenal. Figura 3II: Piezas bucales. A: Palpos maxilares; B: Palpos labiales; C: Epifaringe; D: Maxilas; E: Lacinias.

Tórax

Existen tres segmentos torácicos bien diferenciados: protórax, mesotórax y metatórax (Figura 4). Estos segmentos se encuentran reducidos en pulgas de tipo penetrante o semipenetrante como, por ejemplo, en las especies de la familia Tungidae. El pronoto puede o no presentar

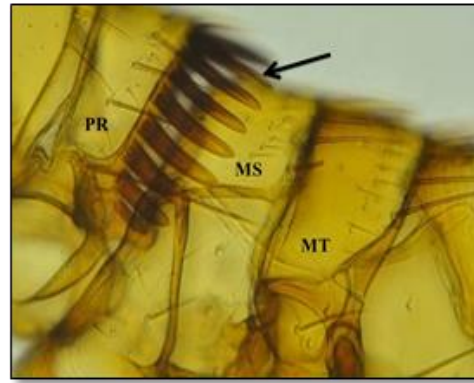


Figura 4: Tórax de un sifonáptero de la especie *N. barbarus*. PR: Protórax; MS: Mesotórax; MT: Metatórax. La flecha señala el peine pronotal.

ctenidio pronotal con mayor o menor cantidad de espinas (Figura 4), a veces vestigial e incluso a veces localizado en el metanoto. El prosterno puede, o no, proyectarse inferiormente entre las coxas. La metapleura se divide en metepisterno y metepímero, este último suele cubrir en la mayoría de las especies el primer segmento abdominal. La mesopleura a veces en ciertas especies está dividida y en otras se encuentra ensanchada. Existen un par de espiráculos en cada uno de los segmentos pleurales, de ellos el espiráculo del metepímero tiene gran importancia en sistemática (Beaucournu y Launay, 1990; Linardi y Guimarães, 2000).

Patas

Los sifonápteros como el resto de los Órdenes que conforman la Clase Insecta, poseen tres pares de patas de los cuales, el último se encuentra más desarrollado que los otros dos (Figura 5I). La función de este último par es proporcionar a la pulga una gran capacidad de salto, lo cual es fundamental para poder colonizar nuevos hospedadores. Además, el tercer par de patas también está considerado como el más importante desde un punto de vista taxonómico. Cada pata se compone de una serie de segmentos o regiones que consisten en una gran coxa basal seguida de una pequeña región que

funciona a modo de rótula denominada trocánter. Los otros tres segmentos son: el fémur, la tibia y por último el tarso completando así los apéndices ambulatorios (Figura 5I). El tarso a su vez está dividido en 5 segmentos o tarsómeros de los cuales el segmento más apical denominado distitarsómero acaba en un par de uñas que pueden ser simétricas o asimétricas y que a veces en la suela presentan un número variable de cerdas plantares (Figura 5I y 5II). También cabe destacar que en todas las patas el cuarto tarsómero es el de menor tamaño, mientras que los otros cuatro varían en longitud según la especie, lo que también lo convierte en un carácter de gran importancia taxonómica. La metacoxa puede presentar en algunas especies cerdas espiniformes mientras que la mesocoxa presenta una línea de fractura que puede ser completa o incompleta. El metafémur de los tres pares de patas también puede presentar regiones dentiformes mientras que las tibias presentan un gran número de grandes setas que se encuentran agrupadas en penachos. De las tres tibias, la que tiene una mayor importancia taxonómica por el número y distribución de sus setas es la metatibia (Linardi y Guimarães, 2000).

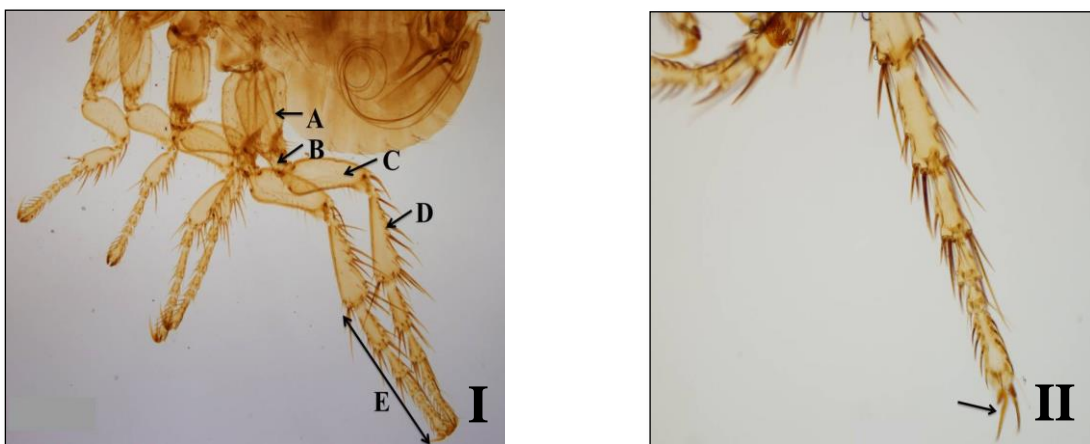


Figura 5. 5I: Patas de un macho adulto de la especie *P. irritans*. A: Coxa; B: Trocánter; C: Fémur; D: Tibia; E: Tarso. Figura 5II: La flecha señala las uñas del distitarsómero.

Abdomen

Los segmentos abdominales están claramente divididos en tergitos (dorsales) y esternitos (ventrales). Cada pulga suele presentar diez tergitos y nueve esternitos, los cuales son nombrados mediante números romanos (Figura 6). Los tergitos por regla general no se encuentran modificados, aunque en algunos géneros aparecen gruesas incrasaciones en dichas estructuras. El margen posterior del tergito VII presenta en ambos sexos un número variable de setas sensoriales bien desarrolladas excepto en los machos de las especies de *Rhadinopsylla*. En los machos, el tergito VIII puede variar de tamaño de unas especies a otras, pero en las hembras éste siempre tiene gran longitud y cubre la mayoría de los segmentos terminales del individuo.

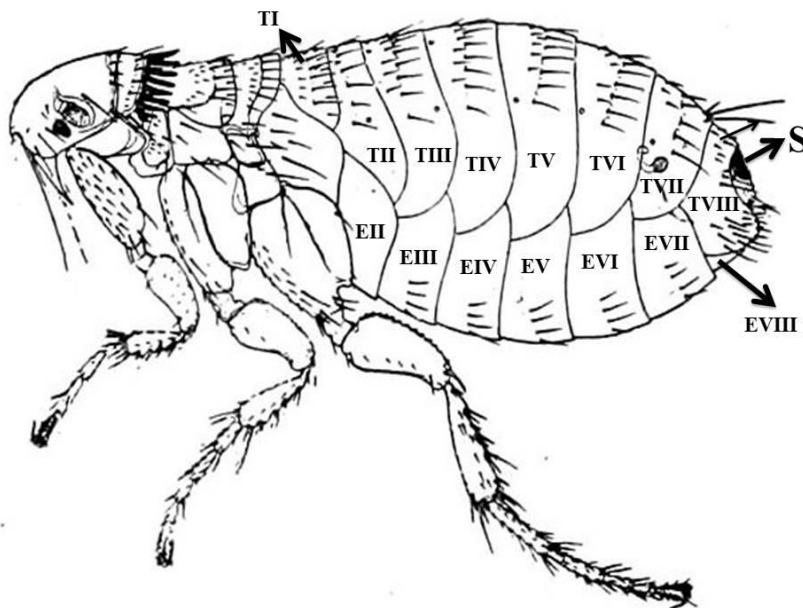


Figura 6: Esquema de la morfología general del cuerpo de una hembra adulta de la especie *N. fasciatus*. T: Tergitos abdominales; E: Esternitos abdominales; S: Sensilium.

Por lo tanto, podemos decir que los segmentos abdominales modificados en los sifonápteros adultos serían los que se localizan por detrás del segmento VII, con lo cual las modificaciones tanto de los tergitos como de los esternitos que se localicen después de este segmento deben considerarse por separado según los sexos (Lewis, 1993; Linardi y Guimarães, 2000). Así, el tergito VIII en las hembras está muy desarrollado cubriendo casi toda, sino toda, la porción terminal del abdomen. Este segmento tiene una gran importancia taxonómica ya que en un gran número de géneros la conformación y la quetotaxia de su margen caudal son usados como criterios para la discriminación de especies. Por otra parte, el esternito VIII se encuentra reducido en la mayoría de los casos a un lóbulo esclerotizado que se proyecta hacia el margen lateral del tergito VIII. El esternito IX es todavía más reducido y membranoso que el esternito VIII e incluso en algunas especies no llega a apreciarse. Una estructura muy característica de las pulgas es el sensilium (Figura 6), una estructura formada por una placa de pequeñas espículas localizada al final del cuerpo de la pulga. Actualmente existen varias teorías sobre la función que desempeña en los sifonápteros, pero la idea más extendida es que posee una función sensorial permitiendo el alineamiento direccional de la genitalia durante la cópula. Los especialistas aún mantienen diferencias a la hora de determinar el segmento en el cual se encuentra esta estructura junto con el estilete anal en las hembras, que a menudo, posee una seta apical de gran longitud junto con un número variable de pelos cortos subapicales. Algunos estudios lo sitúan en el tergito IX, mientras que otros localizan la posición del sensilium sobre el tergito X o, directamente, han denominado a este segmento esternito X (Lewis, 1993).

Segmentos modificados

En los machos el órgano copulador presenta un aspecto enrollado en la mayoría de las especies y se le denomina aedeagus (Figura 7). Es una estructura extremadamente

compleja que rara vez es usada para la identificación específica; Sin embargo, las estructuras asociadas al aedeagus que derivan de los tergitos terminales son las estructuras principales que se utilizan para llevar a cabo discriminaciones taxonómicas en los machos. El esternito VIII puede estar reducido en casi toda su extensión o encontrarse de manera vestigial. Sin embargo, cuando está presente, esta estructura presenta la forma de un lóbulo que se proyecta ventralmente. En estos casos, el esternito VIII presenta una serie de modificaciones y caracteres taxonómicos como la presencia y distribución de sus espículas o su quetotaxia, que son muy útiles en la identificación a nivel de género y especie. El esternito IX está formado por dos partes diferentes que se encuentran fusionadas ventralmente. Así, podemos distinguir un brazo proximal y otro brazo distal. En la mayoría de los géneros la configuración y quetotaxia de este último brazo tiene gran importancia taxonómica. El tergito IX está modificado dando lugar a una estructura denominada clasper, que a su vez se presenta dividida en una parte fija llamada basímero y una parte móvil denominada telómero (Beaucournu y Launay, 1990; Lewis, 1993; Linardi y Guimarães, 2000) (Figura 7).

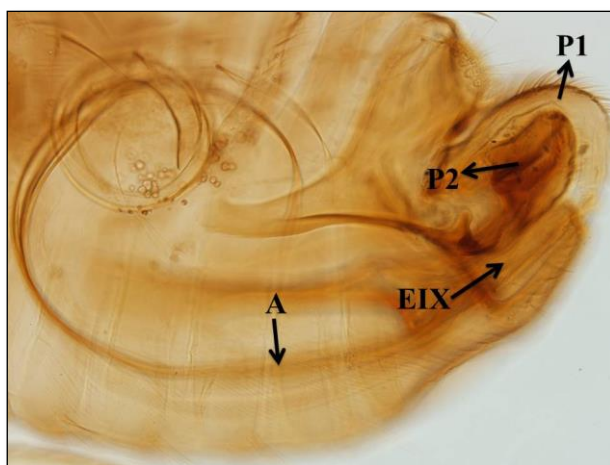


Figura 7: Genitalia de un macho de *P. irritans*. A: Aedeagus; EIX: Esternito IX; P1: Parte fija del clasper (Basímero); P2: Parte móvil del clasper (telómero).

En las hembras, según los grupos de pulgas considerados tanto el tergito VIII como el esternito VII poseen una gran variedad morfológica, lo que los convierte en dos

estructuras de una gran importancia taxonómica. En todas las hembras se puede observar la presencia de una estructura denominada espermateca (Figura 8), que presenta una forma característica en un gran número de especies. La espermateca a su vez se divide en dos regiones: bulga (cuerpo o cabeza) e hilla (apéndice caudal), pudiendo existir una línea demarcatoria que separa ambas regiones. El orificio en el cual se encuentra situada la espermateca se conoce con el nombre de área cribiforme. Sólo en algunos individuos se puede llegar a apreciar a simple vista un conducto denominado bolsa copuladora que representa una continuación alargada de la propia espermateca. Todas las hembras no penetrantes presentan un estilete anal junto a una seta de gran longitud que se localiza justo antes del ano. Por último, cabe destacar la presencia del lóbulo anal ventral o esternito X que puede presentarse, tanto en hembras como en machos, variando en forma y quetotaxia, a veces a nivel intraespecífico (Lewis, 1993; Linardi y Guimarães, 2000).

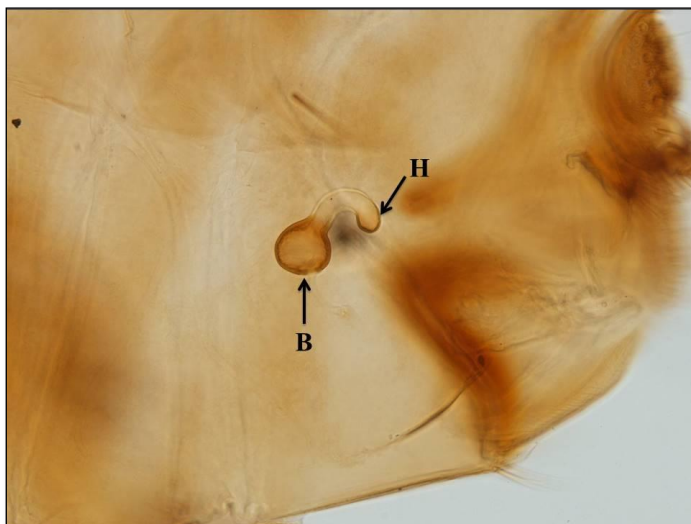


Figura 8: Espermateca de una hembra de *P. irritans*. B: Bulga; H: Hilla.

Fases de desarrollo de los sifonápteros

Los huevos de sifonápteros son pequeños entre 0,1 y 0,5 milímetros, ovoides y de color blanco. De éstos, emergen las larvas que se caracterizan por ser alargadas,

vermiformes, pequeñas, ápodas, sin ojos desarrollados y con el cuerpo cubierto de numerosas setas gruesas, especialmente en los segmentos distales. Todas poseen una cabeza bien desarrollada armadas con un par de mandíbulas masticadoras y un par de glándulas de seda que son las encargadas de producir la seda para dar lugar a la formación del capullo de la pupa. Aunque pocas larvas de pulgas pueden ser identificadas a nivel específico, la mayoría de ellas sí pueden ser clasificadas a nivel de familia en función de la forma que presentan las papilas sensoriales presentes en la cabeza o la distribución de las setas y órganos sensoriales (Durden y Traub, 2002).

La pupa de los sifonápteros es exarata, ya que las distintas partes del cuerpo y órganos como las antenas, piezas bucales y patas se encuentran libres o sueltas y se reconocen con facilidad. Además, estas pupas están rodeadas por un capullo de seda desechable que ha sido formado por el último estadio larvario. Muchas veces debido a las propiedades adherentes de la seda de este capullo temporal, los restos del suelo quedan adheridos a la pupa, haciendo que ésta sea muy difícil distinguir a simple vista del resto de materia que la rodea, ayudando a su camuflaje. Algunas especies adultas poseen un tubérculo frontal en la cabeza que les sirve de ayuda para romper el capullo y poder liberarse. Este tubérculo puede degenerar y desaparecer o bien permanecer durante toda la vida, como por ejemplo en los individuos del género *Nosopsyllus* (Durden y Traub, 2002).

I.2.2. Ciclo biológico

En el ciclo biológico de las pulgas, se pueden encontrar las fases de huevo, larva (generalmente con 3 estadios), pupa y adulto (Figura 9). Las hembras grávidas de la mayoría de especies que se han estudiado pueden producir cientos de huevos durante toda su vida. Estos huevos tienen una textura pegajosa y suelen adherirse brevemente al

pelaje del hospedador, sin embargo, al poco tiempo acaban desprendiéndose, cayendo al suelo normalmente en zonas frecuentadas por éste, donde eclosionarán aproximadamente a los 5 días de la ovoposición. Algunas especies de pulgas depositan directamente los huevos en el suelo, cerca del entorno del hospedador, ya que constituye una zona rica en restos de materia orgánica. Así, las hembras de la especie *Stenoponia tripectinata*, una pulga característica de roedores de la región paleártica depositan los huevos pegados al material que se encuentra en el suelo del nido de los roedores a los que parasita (Durdén y Traub, 2002).

Una vez que la larva sale del huevo, ésta se alimenta de la materia orgánica presente en el suelo o procedente de las heces del propio hospedador. En algunas especies, como por ejemplo las larvas de *Nosopsyllus fasciatus*, se ha observado que las propias larvas agreden a las pulgas adultas hasta conseguir que éstas excreten heces ricas en sangre, que serán usadas por las propias larvas como alimento. Por último, también se ha demostrado que las larvas pueden alimentarse de pequeños artrópodos que se encuentran en el entorno del hospedador, pulgas adultas muertas o incluso de otras larvas de menor tamaño. Por todo esto, las larvas se encuentran habitualmente conviviendo con sus hospedadores ya sea en el cuerpo del propio animal, como por ejemplo *Uropsylla tasmanica*, o en los refugios del mismo. Tras dos o tres semanas, en las cuales se producen dos mudas, las larvas alcanzan su desarrollo máximo y empiezan a formar el capullo de seda utilizando sus glándulas sedosas. Dos o tres días después de formarse el capullo larvario o prepupa, se produce una muda de la cutícula dando lugar a la pupa propiamente dicha (Durdén y Traub, 2002).

La duración del estado de pupa dependerá de la temperatura ambiente, pero por regla general este estadio suele mantenerse durante una o dos semanas, hasta que el adulto emerge de la cutícula puparia. Para que este hecho se produzca, la pulga adulta

necesita algún tipo de estímulo (generalmente la vibración del exterior) para abandonar el capullo, de lo contrario la pulga permanecerá viable pero inactiva dentro del mismo. Esto explica por qué cuando un animal se establece por primera vez en un lugar infestado por pulgas que ha estado inhabitado durante largos periodos de tiempo es atacado de manera agresiva por innumerables pulgas. Este hecho se ve facilitado por la gran capacidad de permanecer en ayuno durante largos periodos de tiempo, lo que les permite volver a alimentarse cuando localizan un nuevo hospedador (Lewis, 1993).

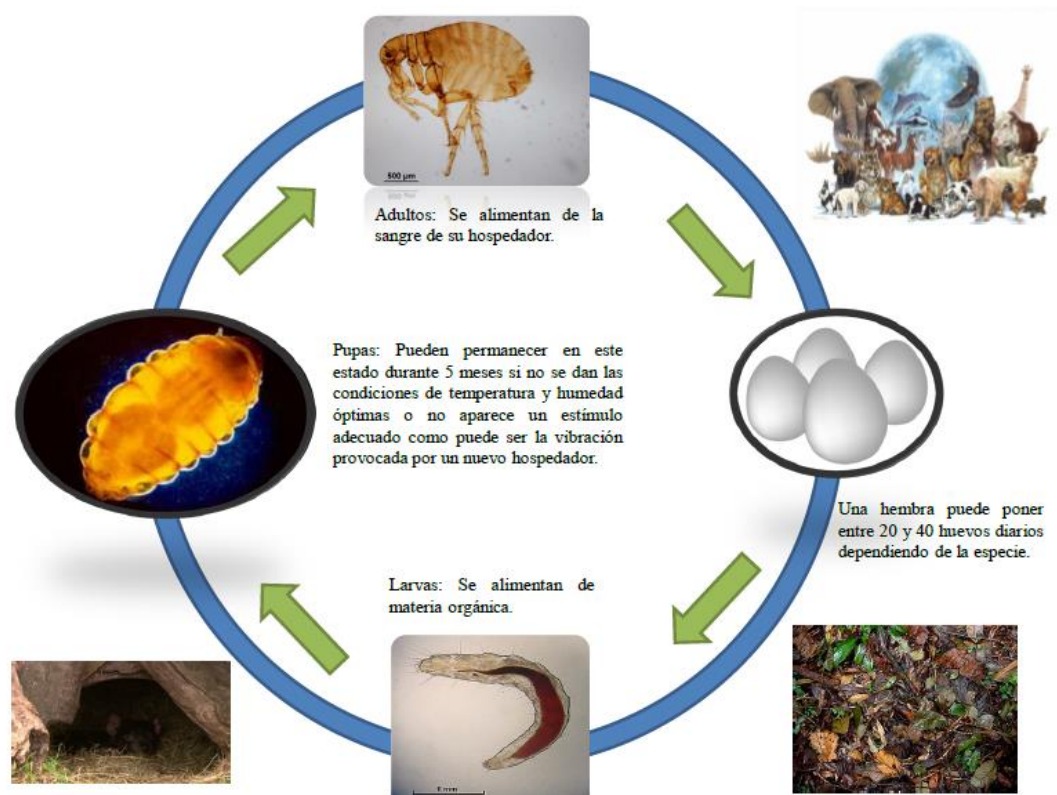


Figura 9: Esquema del ciclo biológico de los sifonápteros.

Respecto a la reproducción de los sifonápteros, se conoce que los adultos de un gran número de especies pueden realizar la cópula inmediatamente después de emerger del capullo, comenzando la producción de huevos al día siguiente. Las hembras necesitan alimentarse antes de realizar la primera ovoposición. En algunas especies no se ha encontrado relación alguna entre los períodos de alimentación de los hospedadores

con los del propio sifonáptero. Sin embargo, en algunas especies como *Spilopsyllus cuniculi*, el patrón de comportamiento y desarrollo de las pulgas está estrechamente relacionado con el de su hospedador (Lewis, 1993).

La mayoría de las especies de pulgas no son estrictamente específicas de un hospedador en concreto, pero sí de unas condiciones ambientales concretas (Lewis, 1993). Esto significa que para que el ciclo de la pulga se desarrolle de manera óptima es prioritario que se den unas condiciones de humedad, temperatura y pH adecuadas antes que un tipo específico de especie hospedadora. Por este motivo, es frecuente que muchas de las especies se hayan descrito sobre más de un hospedador. No obstante, la escasa especificidad de hospedador de los sifonápteros dependerá de los constituyentes hemáticos y de las condiciones físicas (temperatura y humedad) del entorno en el que se desenvuelve el hospedador. Este hecho explicaría que aquellos mamíferos sin un refugio usual no sean hospedadores habituales de las pulgas. Aun así, se han encontrado casos de especies de sifonápteros que parasitan este tipo de hospedadores ya que se han adaptado de manera extraordinaria a tener una asociación permanente con algunos de estos animales (Lewis, 1993).

I.2.3. Epidemiología e importancia sanitaria

La importancia sanitaria de los sifonápteros para la salud humana está bien documentada desde hace siglos. En la actualidad, la trascendencia de este grupo de artrópodos en sanidad sigue siendo significativa debido, en parte, al estrecho contacto del hombre con animales domésticos y peridomésticos (Martínez-Carrasco y col., 2007). Este íntimo contacto, puede originar alteraciones patológicas en el hombre mediante diferentes mecanismos. Así, pueden provocar lesiones de forma directa como consecuencia de la propia hematofagia. Asimismo, los sifonápteros pueden actuar, de

forma indirecta, como hospedadores intermediarios de otros parásitos o participar como vectores en la transmisión de diferentes agentes patógenos.

I.2.3.1. Importancia de las pulgas como ectoparásitos

Como otros insectos hematófagos, cuando una pulga inserta sus piezas bucales en la piel de su hospedador inyecta saliva y comienza a succionar su sangre. Entre las sustancias que introduce con la saliva se incluyen algunas que dificultan la coagulación de la sangre y a la vez se produce una respuesta inmune por parte del hospedador que se manifiesta con la aparición de eritema y edema. Así, las picaduras de pulgas pueden provocar una irritación intensa durante varios días y se caracterizan por la formación de una delgada mancha de color púrpura “purpura pulicosa” rodeada por una pequeña zona inflamada de la piel o “roseola pulicosa” (Figura 10). En la mayoría de los casos, el picor y las lesiones provocadas en la piel por la picadura desaparecen a los cuatro o cinco días.



Figura 10: Lesiones típicas provocadas por picaduras de sifonápteros.

Sin embargo, las personas que presentan hipersensibilidad a la saliva de las pulgas pueden desarrollar casos de dermatitis asociada a la picadura. En individuos sensibilizados se desarrollan unas lesiones papulosas alrededor de la picadura inicial dando lugar a una urticaria papular que en algunos casos pueden evolucionar en lesiones de mayor tamaño, sobre todo

cuando se trata de niños. En algunos casos más serios se han observado fenómenos de descamación y decoloración de la piel. En niños, estas lesiones se localizan por todo el cuerpo mientras que en adultos suelen reducirse a la región de las extremidades inferiores. También se han descrito casos de hipersensibilización por contacto o inhalación de las propias heces de sifonápteros o restos de su exoesqueleto (Baldo, 1993).

Mención especial merece la especie *Tunga penetrans*, conocida vulgarmente como pique, pulga de la arena o ``jigger´´, por su gran importancia en salud animal debido a que las hembras tienen la capacidad de penetrar en la piel de su hospedador (incluido los humanos) provocando unas lesiones muy características en forma de ampollas que dan lugar a un cuadro clínico denominado tungiasis. Esta especie está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales sobre todo en el continente americano (Durden y Traub, 2002).

I.2.3.2. Pulgas como vectores de enfermedades

Debido a su capacidad vectorial, los artrópodos han sido responsables de numerosas plagas y brotes epidémicos en humanos con altos niveles de morbilidad y mortalidad a lo largo de la historia. Este hecho, ha provocado que numerosos centros de investigación en todo el mundo se hayan dedicado al estudio de algunos de estos grupos, fundamentalmente garrapatas y mosquitos (Eisen y Gage, 2012). A pesar de esto, se ha mostrado poca atención a las zoonosis transmitidas por pulgas, algunas de ellas con una importante repercusión humana y económica a lo largo de los años como la peste o el tifus murino. Aunque la incidencia de estas enfermedades ha disminuido considerablemente, todavía causan pequeños brotes en algunas regiones, y podrían reemerger en forma de epidemias debido al cambio climático y medioambiental provocado por las actividades humanas. No obstante, y a pesar de que numerosos

microorganismos localizados en la sangre de vertebrados son susceptibles de ser transmitidos por sifonápteros no hay certeza de su papel vectorial en la transmisión de ciertos patógenos causantes de graves enfermedades. Para muchos de estos sifonápteros, la temperatura y la humedad son esenciales para su desarrollo y supervivencia, por lo que un calentamiento global podría conducir a una expansión de estos vectores hacia otras latitudes llevando consigo nuevos patógenos causantes de enfermedades hasta ahora controladas en estas áreas (Bitam y col., 2010). Si a esto le añadimos la reemergencia de ciertas bacterias patógenas transmitidas por pulgas como *Bartonella henselae* o *Rickettsia felis* no es de extrañar que el número de trabajos relacionados con la detección de patógenos en este grupo de insectos esté aumentando de manera exponencial en los últimos tiempos (Leulmi y col., 2014).

El papel de las pulgas en la epidemiología, ecología y transmisión de enfermedades infecciosas ha sido estudiado con profundidad en casi todas las regiones del mundo: Norte América (Eisen y Gage, 2012), África (Leulmi y col. 2014), Europa (Mencke, 2013), Oceanía (Chandra y col., 2017), Asia (Maleki-Ravasan y col., 2017), Sudamérica (Maco y col., 2011) o incluso desde un punto de vista mundial (Dobler y Pfeffer, 2011).

En la mayoría de estos trabajos, las técnicas moleculares de PCR estándar y PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) fueron las elegidas como técnicas de referencia a la hora de llevar a cabo los ensayos epidemiológicos para la detección de patógenos en las muestras estudiadas. Como ya hemos comentado en secciones anteriores, mediante la técnica de PCR estándar podemos amplificar de manera específica una región de ADN determinada de cualquier organismo. De este modo, y de la misma manera que se utiliza para análisis filogenéticos y taxonómicos de distintas especies de insectos, podemos amplificar una región determinada del organismo patógeno mediante la

utilización de cebadores específicos. Aunque haya sido demostrado que cuando la región de material genómico del patógeno a detectar es grande, la técnica de qPCR posee una mayor sensibilidad que la PCR estándar (Kidd y col., 2018), ambas técnicas deben utilizarse conjuntamente a la hora de realizar estudios donde se evalúe la prevalencia de diversas especies patógenas en sifonápteros u otros artrópodos.

Los patógenos transmitidos por pulgas pueden pertenecer a diversas clases: protozoos, bacterias o virus entre otros. La transmisión de estos microorganismos se suele realizar de un hospedador a otro a través de las piezas bucales, la saliva, alimento regurgitado procedente del canal digestivo o bien mediante heces infectadas (Bitam y col., 2010).

Las pulgas están involucradas en la transmisión de las siguientes enfermedades:

Peste (*Yersinia pestis*): La peste es una enfermedad infecciosa provocada por una bacteria Gram negativa conocida como *Yersinia pestis*. A esta enfermedad también se le conoce como muerte negra o peste a secas, y actualmente está considerada la enfermedad más importante de todas las transmitidas por pulgas a los humanos. La transmisión de *Y. pestis* de roedores a humanos se produce mediante la picadura de pulgas, especialmente por pulgas del género *Xenopsylla* dentro del cual destaca por su capacidad como vector de esta enfermedad la pulga de la rata oriental *Xenopsylla cheopis* (Durdan y Traub, 2002).

Respecto a las pulgas involucradas en la transmisión de *Y. pestis*, además de la ya mencionada *X. cheopis* como especie principal en este ciclo, existen al menos 125 especies de pulgas capaces de transmitir la enfermedad como por ejemplo *Oropsylla montana* y *Hoplopsyllus anomalus* cuyo papel como vector de la enfermedad ha sido ampliamente estudiado en distintas regiones de Norte América. En Asia por su parte, las

especies más estudiadas en este sentido han sido aquellas pertenecientes a los géneros *Citellophilus*, *Neopsylla* y *Ctenophthalmus* (Durden y Traub, 2002). A todos estos géneros y especies hay que añadir dos especies cosmopolitas como son *Pulex irritans* y *N. fasciatus* cuya capacidad para transmitir *Y. pestis* también ha sido demostrada. A día de hoy aún siguen apareciendo nuevas especies de pulgas como *Xenopsylla skrjabini*, *Xenopsylla minax*, *Xenopsylla conformis* o *Echidnophaga oschanini* entre otras, capaces de transmitir la enfermedad (Zhang y col., 2015).

Las pandemias de la peste han tenido un impacto enorme en la civilización humana, ya que han acabado con más vidas que cualquier guerra conocida hasta la fecha. Al menos tres grandes pandemias han sido documentadas hasta el día de hoy. La primera, originada en África y posteriormente distribuida hacia Europa, se le conocía como peste de Justiniano y acabó con la vida de 40 millones de personas durante los siglos VI y VII. La segunda pandemia, denominada como peste negra, se originó en Asia central en el siglo XIV y rápidamente se expandió por toda Europa. Esta pandemia se perpetuó por más de 200 años alcanzando su punto álgido durante los años 1346 y 1361 y aunque los datos de la mortalidad varían según las fuentes, se cree que acabó con la vida de un tercio de la población europea. La última gran epidemia de peste se originó en la provincia China de Yunnan en 1855 durante el periodo comprendido entre 1896 hasta 1948. Se piensa que acabó con la vida de 12 millones de personas solo en la región de India y países vecinos (Durden y Traub, 2002).

Tifus murino (*Rickettsia typhi*): El tifus murino también conocido como tifus endémico o tifus mexicano está causado por el microorganismo *Rickettsia typhi*. Esta enfermedad cursa con cefaleas, fiebre (por periodos de permanencia de más de dos semanas), escalofríos, dolores articulares o artralgias, náuseas, vómitos, tos y dolores abdominales y en la columna vertebral (Bechah y col., 2008). Aunque es típica de

roedores, puede ocasionalmente infectar a los humanos por medio de ectoparásitos como los sifonápteros que parasitan estos roedores. Aunque bajo condiciones de laboratorio se ha demostrado que las pulgas pueden transmitir este patógeno directamente a través de su picadura, la forma más común de transmisión es a través de las heces del parásito. Los sifonápteros se contagian de *R. typhi* cuando se alimentan de la sangre de un hospedador que posee dicho microorganismo en su torrente sanguíneo (Azad y Beard, 1998). La distribución geográfica del tifus murino es mundial, y aunque aún existen focos de la enfermedad en diversas regiones de China, norte de África, Tailandia y América Central, el número de casos ha disminuido considerablemente en los últimos años (Eisen y Gage, 2012).

Los reservorios principales de *R. typhi* son roedores que viven en las zonas domésticas en contacto directo con los seres humanos como las especies *Rattus rattus* ó *Rattus norvegicus*. Por otra parte, respecto a las especies de pulgas que pueden transmitir *R. typhi*, la más común, como en el caso de la peste bubónica, es la especie *X. cheopis*. Así, la mayoría de brotes documentados de tifus murino están asociados a un aumento de esta especie en una zona geográfica determinada. Otras especies de pulgas que podrían actuar como vectores de la enfermedad serían *Xenopsylla astia*, *Xenopsylla bantorum*, *Xenopsylla brasiliensis*, *Ctenocephalides felis*, *P. irritans*, *Leptopsylla segnis*, y *N. fasciatus*, siendo todas estas especies parásitas de roedores a excepción de *P. irritans* y *C. felis* (Durden y Traub, 2002).

Rickettsia felis, también conocida como ``ELB agent`` (El Labs) y agente causal de la fiebre eruptiva fue detectada por primera vez en 1918 (Bitam y col., 2010) y en los últimos años su amplia expansión geográfica ha provocado que sea la especie de *Rickettsia* más distribuida en todo el mundo. Aunque sea genéticamente distinta a *R. typhi*, *R. felis* ha sido detectada en pacientes que padecían enfermedades similares al

tifus murino en cuanto a su sintomatología. *C. felis* ha sido identificado como el principal reservorio y vector de esta enfermedad aunque se ha detectado en al menos 11 especies diferentes de pulgas, entre las que se encuentran algunas que pueden parasitar a humanos como *P. irritans*, *Archaeopsylla erinacei*, *Echidnophaga gallinacea*, *Ctenocephalides canis*, *T. penetrans* y *X. cheopis* (Eisen y Gage, 2012). En países como España, *R. felis* ha sido detectada a nivel molecular en la especie de pulga *C. felis*, lo cual sugiere que este patógeno está bien establecido en nuestro país. En consecuencia, gatos y perros de compañía, infestados con *C. felis*, tanto como las personas en contacto con ellos, están expuestos a este patógeno (Márquez y col., 2006; Blanco y Oteo, 2006; Bernabeu-Wittel y col., 2006). Así, estudios serológicos llevados a cabo en España revelaron que un 7 % de los individuos testados eran seropositivos a anticuerpos de *R. felis*, sugiriendo que la mayoría de infecciones en humanos provocadas por este patógeno no están diagnosticadas ni reconocidas (Reif y Macaluso, 2009).

Otras rickettsiosis: Además del agente causal del tifus murino, un gran número de rickettsiosis pueden ser transmitidas a los humanos por la picadura de las pulgas. Entre todas éstas cabe destacar a *Coxiella burnetti*. El género *Coxiella* es morfológicamente similar a las rickettsias pero con ciertas diferencias genéticas y fisiológicas, de ahí que la hayamos incluido en este apartado. *C. burnetti* es el agente causal de la *fiebre Q*, una enfermedad que se presenta principalmente en personas que manipulan y viven en contacto con cabras, ovejas, gatas parturientas y vacas. La presencia de este patógeno en sifonápteros ha sido recientemente documentado por Psaroulaki y col. (2014), quienes constataron la presencia de *C. burnetti* en *C. canis*, *C. felis* y *X. cheopis* que parasitaban distintas especies de zorros y roedores de Chipre.

Bartonelosis: *Bartonella* es una bacteria Gram negativa que afecta principalmente a los glóbulos rojos. De las más de 20 especies descritas, más de la

mitad infectan tanto a personas inmunodeprimidas como a personas inmunocompetentes (Mogollon-Pasapera y col., 2009). Entre las especies más importantes se encuentran los agentes causales de 3 importantes enfermedades: La fiebre de Oroya (*Bartonella bacilliformis*), la fiebre de las trincheras (*Bartonella quintana*) y la enfermedad por arañazo del gato (*Bartonella henselae* y *Bartonella clarridgeiae*). De éstas sólo las dos últimas se piensa que pueden ser transmitidas por pulgas. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha no aclaran si esta transmisión se produce por la propia picadura de la pulga o por medio de la inhalación de heces de pulgas infectadas con el patógeno (Eisen y Gage, 2012). Además, se ha estudiado el posible papel de los perros en la transmisión de la enfermedad por arañazo del gato, llegándose a la conclusión de que éstos actuarían como reservorios primarios u hospedadores accidentales (Chomel y col., 2009) al ser infectados por picaduras de pulgas que están en contacto directo con gatos salvajes infectados (Dobler y Pfeffer, 2011). Por lo tanto, esta enfermedad, como su propio nombre indica, se da en humanos principalmente como consecuencia de arañazos o mordeduras de gatos o perros infectados, cuyas uñas se encontraban infectadas con heces de pulgas que contenían el patógeno (Keret y col., 1998; Tsukahara y col., 1998). Los estudios realizados en España donde *B. henselae* fue detectada con una prevalencia media del 20 % en perros, demuestran una alta exposición a este patógeno en nuestro país (Blanco y Oteo, 2006; Márquez y col., 2009).

I.2.3.3. Pulgas como hospedadores intermediarios de helmintos

Algunas especies de sifonápteros actúan como hospedadores intermediarios de la fase de cisticercoide de 3 especies de cestodos que ocasionalmente pueden infectar a los humanos. De estas tres especies la más importante desde un punto de vista sanitario es *Dipylidium caninum*, especie cuyos individuos adultos son parásitos intestinales de los perros. Las proglótides grávidas de *D. caninum* son liberadas al intestino del

hospedador definitivo, y los huevos salen con las heces del hospedador al exterior. Estos huevos liberados (Figura 11) son ingeridos por las larvas de pulgas de especies que parasitan al perro como *C. felis*, *C. canis* o *P. irritans*, aunque alguna especie de piojos como *Trichodectes canis* también puede actuar como hospedador intermediario. Dentro de las larvas de pulgas, los huevos del cestodo eclosionan y se empieza a desarrollar el cisticercoide lentamente hasta que la larva de pulga se transforma en pupa y este desarrollo de la fase larvaria del cestodo se vuelve mucho más rápido, de tal manera que mucha de las muertes que se dan en la fase de pupa en las pulgas son debidas a este helminto. La infestación a los humanos se produce cuando una persona ingiere de manera accidental una pulga infestada con *D. caninum*.

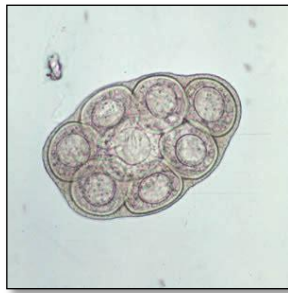


Figura 11: Cápsulas ovíferas de *Dipylidium caninum*.

En ese momento los cisticercoides son liberados del interior de la pulga por la acción de las enzimas digestivas convirtiéndose el humano en el hospedador definitivo. Como consecuencia de este mecanismo de infestación, no es de extrañar que la mayoría de los casos de transmisión de *D. caninum* en humanos se produzcan en niños pequeños que pasan una gran cantidad de tiempo jugando con sus mascotas (Eisen y Gage, 2012).

Las otras dos especies de cestodos que pueden utilizar las pulgas como hospedadores intermediarios son *Hymenolepis diminuta* e *Hymenolepis nana*. El desarrollo y la transmisión de estos cestodos son similares a los observados en *D. caninum*. Sin embargo, en este caso las especies implicadas en su transmisión son

principalmente pulgas que parasitan a roedores como *N. fasciatus* o *X. cheopis*, aunque también se ha encontrado que *C. canis* o *P. irritans* pueden actuar como hospedadores intermediarios (Eisen y Gage, 2012).

I.2.4. Taxonomía del Orden Siphonaptera

Uno de los principales impedimentos en el estudio de la evolución y la filogenia de los sifonápteros ha sido su alto grado de especialización morfológica como consecuencia de su forma de vida ectoparásita (Whiting, 2002b). Este alto grado de especialización puede observarse en distintas partes del cuerpo como la cabeza, el tórax y la genitalia. Estos caracteres tan especializados para cada individuo no suelen ser especialmente informativos y válidos para su uso en reconstrucciones filogenéticas. Sin embargo, el que se compartan estos caracteres en casi todas las especies refuerza la hipótesis del carácter monofilético del Orden Siphonaptera (Krasnov, 2008). Este hecho ha sido demostrado tanto desde un punto de vista morfológico (Medvedev, 2001a, b) como molecular (Whiting, 2002a). No obstante, no existe consenso en otras cuestiones como la relaciones filogenéticas entre las familias, géneros y especies de este Orden, el origen de su adaptación al parasitismo, la relación con otros grupos de insectos o si ha existido una coevolución de algunas especies con sus hospedadores (Krasnov, 2008).

I.2.4.1 Ancestro y grupo hermano

Aunque los fósiles de pulgas son extraordinariamente raros, existen varios descubrimientos de pulgas conservadas en el ámbar báltico y dominicano. Las pulgas del ámbar báltico (*Palaeopsylla dissimilis*, *Palaeopsylla klebsiana* y *Palaeopsylla baltica*) proceden del Eoceno temprano (Dampf, 1911; Peus, 1968), mientras que *Pulex larimerius* y *Rhopalopsyllus* sp. procedentes del ámbar Dominicano datan del Mioceno

(Lewis y Grimaldi, 1997). Algunas evidencias incluso sugieren que las pulgas existieron en la época mesozoica, aunque su relación con los mamíferos de esta etapa es incierta. Varios insectos del Jurásico tardío han sido considerados como las primeras pulgas existentes o sus taxones ancestrales (Riek, 1970; Ponomarenko, 1986) debido a las similitudes encontradas en diversas estructuras morfológicas entre algunos sifonápteros y algunos de los fósiles de dichos insectos como los de *Strashila incredibilis* o *Saurophthirus* sp. (Rasnitsn, 1992; Ponomarenko, 1986). Otros de estos insectos fósiles encontrados con características morfológicas parecidas a las pulgas datan de la época cretácica como la especie *Tarwinia australis* (Lukashevich y Mostovsky, 2003). Sin embargo, todas estas teorías sobre el antecesor y el origen del Orden Siphonaptera nunca han podido demostrarse con certeza e incluso en algunos casos se ha argumentado en sentido contrario. Así, recientemente Zhu y col. (2015) aseguraban que, si bien *Tarwinia australis* parecía, por tiempo y lugar, ser el ancestro más antiguo encontrado de las pulgas tal y como las conocemos hoy en día, no existen evidencias directas que sugieran que esa especie ya estaba adaptada a un estilo de vida como ectoparásito, con lo cual su relación evolutiva con las actuales pulgas es ambigua. Además, estos autores sugieren que la Subclase de los terios (mamíferos placentarios y marsupiales) fueron los hospedadores más primitivos de los sifonápteros.

Respecto al lugar que ocupa el Orden Siphonaptera dentro de los insectos holometábolos, actualmente la hipótesis filogenética más aceptada es la que establece al Orden Mecoptera como Orden ancestro de los sifonápteros. Esta hipótesis fue inicialmente propuesta por Tillyard (1935) y defendida por Hinton (1958) basándose en la comparación de algunos caracteres típicos de las larvas de ambos Órdenes. Algunos autores como Boudreaux (1979) rechazaron esta hipótesis sosteniendo que el Orden Siphonaptera estaba más relacionado con el Orden Díptera argumentando que los

caracteres que sifonápteros y mecópteros comparten pueden ser en realidad caracteres comunes y generales de insectos pertenecientes a un Orden más primitivo. A pesar de todo, la cercanía de ambos Órdenes ha sido puesta de manifiesto tanto por análisis cladísticos y sistemáticos basados en un gran número de caracteres morfológicos (Kristensen, 1975, 1981; Rothschild, 1975; Beutel y Gorb, 2001) como por datos moleculares (Whiting 2002b; Dallai y col., 2003)

I.2.4.2. Taxonomía del Orden Siphonaptera en base a criterios morfológicos

Si bien existe un amplio conocimiento de la taxonomía de las pulgas a nivel de especies y subespecies, de su biología y su papel vectorial, el Orden Siphonaptera es, desde el punto de vista filogenético, uno de los menos estudiados entre los insectos holometábolos (Whiting y col., 2008). Así, en los últimos años, de los numerosos artículos publicados relacionados con pulgas, solo un escaso número estaban basados en análisis cladísticos (Linardi y Guimaraes, 1993; Lu y Wu, 2003; Blank y col., 2007).

Como ya se ha mencionado, el mayor obstáculo para el establecimiento de relaciones filogenéticas dentro de este Orden, es el alto grado de especialización morfológica que tienen las pulgas debido al ectoparasitismo y la incapacidad de los taxónomos para homogeneizar caracteres de manera adecuada entre las pulgas y otros grupos de referencia (Whiting y col., 2008). La mayoría de los caracteres usados para el diagnóstico de especies están basados en la forma y estructura, bien de su compleja genitalia y/o de su cabeza o en la presencia y distribución de las setas y espinas que ornamentan todo su cuerpo (Traub y Starcke, 1980; Dunnet y Mardon, 1991; Hastriter y Whiting, 2003). Aunque estos caracteres son excelentes para el diagnóstico a nivel específico, la mayoría son autapomórficos a nivel de especies y de utilidad limitada para realizar reconstrucciones filogenéticas. Además, a este problema hay que añadir que las

pulgas presentan casos de evolución paralela en su morfología, probablemente asociada con la capacidad de parasitar hospedadores similares, ocultando de esta manera la existencia de casos de homología entre diferentes especies (Holland, 1964).

Comparados con la mayoría de insectos holometábolos, la clasificación de las pulgas en base a criterios morfológicos se encuentra relativamente avanzada y no es raro que en la mayoría de los grupos esta clasificación se extienda hasta el nivel de subespecie (Whiting y col., 2008). G. H. E. Hopkins y M. Rothschild publicaron una serie de cinco volúmenes sobre la sistemática de los sifonápteros basándose en la amplia colección de Rothschild (Hopkins y Rothschild, 1953, 1956, 1962, 1966, 1971). Esta serie de volúmenes consideraba la existencia de 12 familias dentro del Orden Siphonaptera (Ancistropsyllidae, Coptopsyllidae, Hypsophthalmidae, Hystrichopsyllidae, Ischnopsyllidae, Leptopsyllidae, Macropsyllidae, Pulicidae, Stephanocircidae, Tungidae, Vermipsyllidae y Xiphiopsyllidae). Actualmente, Hypsophthalmidae está reconocida dentro de Chimaeropsyllidae y la mayoría de taxones incluidos en Hystrichopsyllidae están reconocidos dentro de la familia Ctenophthalmidae por algunos autores como Lewis (1998), aunque otros como Medvedev (1994, 1998) rechazan esta hipótesis. Tres volúmenes complementarios a los otros cinco ya citados, fueron publicados para el resto de familias: Pygiopsyllidae (Mardon, 1981), Ceratophyllidae (Traub y col., 1983), Malacopsyllidae y Rhopalopsyllidae (Smit, 1987). En la actualidad, no existe una clasificación más completa a nivel de familias para el Orden Siphonaptera, ya que las publicaciones de los últimos años relacionadas con la clasificación de las pulgas han tratado principalmente la relación entre Superfamilias (Smit, 1987; Dunnet y Mardon, 1991; Lewis, 1993; Medvedev, 1994, 1998). Lewis (1993, 1998) reconocía 15 familias situadas dentro de cinco Superfamilias: Ceratophylloidea, Hystrichopsylloidea, Malacopsylloidea,

Pulicoidea y Vermipsylloidea. Por otro lado, Medvedev (1994) reconocía 18 familias dentro del Orden, pertenecientes a 4 grandes complejos que más tarde fueron descritos como Infraórdenes: Ceratophyllomorpha, Hystrichopsyllomorpha, Pulicomorpha, y Pygiopsyllomorpha (Medvedev, 1998). Los trabajos de Medvedev (1994, 1998, 2001a, b) están considerados actualmente como los estudios más aceptados a la hora de realizar reconstrucciones filogenéticas entre sifonápteros basadas exclusivamente en criterios morfológicos. Estos trabajos definen una serie de ``compartimentos morfogenéticos`` que representan a la mayoría de los caracteres morfológicos de las pulgas. Además, intentan evaluar estos caracteres morfológicos en cada uno de los grupos de sifonápteros existentes con el fin de aportar caracteres adicionales que apoyen la clasificación de este Orden y así establecer ``tendencias evolutivas`` de dichos caracteres (Whiting y col., 2008). De este modo, el método usado por Medvedev, buscaba encontrar correlaciones entre los segmentos del cuerpo (cabeza, tórax, abdomen) por medio del análisis de los mismos bajo un punto de vista de su relación funcional y su importancia adaptativa (Medvedev, 1994). Sin embargo, algunos autores como Whiting y col. (2008) discutían estos métodos en base a que no eran válidos para buscar evidencias sinapomórficas del carácter monofilico del Orden Siphonaptera, debido a que en estos trabajos no se usaron análisis algorítmicos como los que son utilizados actualmente a la hora de realizar estudios cladísticos. Por todo ello, y debido al gran abandono que ha sufrido el Orden Siphonaptera en los últimos años desde un punto de vista molecular, se hizo imprescindible la necesidad de llevar a cabo estudios taxonómicos y filogenéticos basados en técnicas moleculares con el fin de dilucidar la complicada y poco aceptada clasificación existente de este grupo de insectos holometábolos.

I.2.4.3. Taxonomía del Orden Siphonaptera en base a estudios moleculares

A pesar de que los estudios taxonómicos y filogenéticos de artrópodos basados en técnicas moleculares se vienen realizando desde hace más de 20 años, pocos son los trabajos publicados sobre el Orden Siphonaptera basados en datos moleculares si se comparan con los dedicados a otros grupos de insectos.

Los primeros datos moleculares sobre sifonápteros fueron aportados por Carmean y col. (1992). En este estudio se consideraron secuencias del gen 18S del ADNr para inferir relaciones filogenéticas entre diferentes Órdenes de insectos holometábolos y especies del Orden Siphonaptera. No sería hasta pasados diez años cuando se volvieron a publicar datos moleculares de especies de sifonápteros. En este caso el objetivo de nuevo era analizar las relaciones filogenéticas entre los distintos Órdenes de insectos holometábolos utilizando el marcador 18S (Whiting, 2002a) y las relaciones filogenéticas entre los Órdenes Mecoptera y Siphonaptera usando los genes 18S y 28S del ADNr, la citocromo oxidasa subunidad 2 (*cox2*) y el factor de elongación 1- α (EF1- α) (Whiting, 2002b). A pesar de aportar una valiosa información del lugar que ocupaban las pulgas dentro de la filogenia de los insectos holometábolos, en ninguno de estos trabajos se analizaban relaciones filogenéticas entre familias, géneros o especies basadas en datos moleculares. El primer estudio biogeográfico fue realizado por Dittmar y Whiting (2003), donde se compararon y analizaron las secuencias de ADN de los genes *cox2* y citocromo oxidasa b (*cytb*) de distintas poblaciones de *Pulex simulans* de Perú. Posteriormente, distintos autores utilizaron los Espaciadores Internos Transcritos 1 y 2 (ITS1 e ITS2) como marcadores de referencia a la hora de establecer relaciones filogenéticas entre distintas especies o incluso dentro de una misma especie. Así, Vobis y col. (2004) estudiaron las relaciones filogenéticas existentes entre 7 especies distintas (*C. felis*, *P. irritans*, *T. penetrans*, *C. canis*, *X. cheopis*, *N. fasciatus* y

A. erinacei) usando los marcadores moleculares ITS1, ITS2 y el gen 16S del ADNr (16S). En esta misma línea se sitúan los trabajos de Gamerschlag y col. (2008) y Luchetti y col. (2005, 2007) quienes secuenciaron y analizaron el ITS1, ITS2, *cox2* y 16S de distintas poblaciones de *T. penetrans* y *Tunga trimamillata* procedentes de distintas regiones de Sudamérica y África. A pesar de estas escasas aportaciones sobre estudios moleculares en pulgas, la filogenia del Orden Siphonaptera seguía siendo confusa y así continuó hasta que Whiting y col. (2008) realizaron por primera vez una reconstrucción a gran escala de las relaciones evolutivas existentes entre las distintas familias que conforman el Orden. Para ello, usaron 4 marcadores moleculares: Gen 18S, Factor de Elongación 1- α (FE1- α), *cox2* y gen 28S. En este estudio, además de las relaciones evolutivas entre las distintas familias, se evaluaron las relaciones evolutivas parásito-hospedador. Sin embargo, como el propio autor defendía, aún se necesitaba una profunda revisión taxonómica y filogenética del Orden basada en datos moleculares a nivel de especies y subespecies, así como de algunas familias como Ctenophthalmidae, la cual seguía considerándose un cajón de sastre que englobaba una gran cantidad de géneros y especies cuya verdadera posición dentro de la filogenia de los sifonápteros no estaba aún muy clara. Por todo ello, tras la extensa revisión de Whiting y col. (2008) la mayoría de estudios se centraron en el análisis y comparación de marcadores moleculares (ITS1, *cox1*, *cox2*) de determinadas especies, destacando entre ellas *C. felis*, *C. canis* y *P. irritans* (Mckern y col., 2008; Marrugal y col., 2013; Lawrence y col., 2014, 2015). En algunos de estos trabajos se encontraron diversos haplotipos dentro de una misma especie con diferentes orígenes geográficos (Lawrence y col., 2014) o incluso la existencia de distintas poblaciones en base a criterios morfológicos dentro de la especie *C. felis* que no se correspondían con diferencias moleculares en las secuencias del ITS1 de dichas poblaciones. Todos estos datos pusieron de manifiesto la

necesidad de llevar a cabo estudios taxonómicos y cladísticos en los que se evaluarán tanto datos morfológicos como moleculares.

I.2.5. Uso de la técnica MALDI-TOF MS en el Orden Siphonaptera

El estudio pionero llevado a cabo por Yssouf y col. (2014) constituye el primer testimonio del uso de la técnica MALDI-TOF MS para la identificación específica dentro del Orden Siphonaptera. Estos autores consiguieron obtener espectros de calidad para las especies *C. felis*, *C. canis*, *A. erinacei*, *X. cheopis* y *S. tripectinata* creando una base de datos preliminar que incluía las cinco especies arriba mencionadas. En este estudio además se evaluó y comparó si existían diferencias en los espectros obtenidos a partir de muestras frescas y aquéllas que habían sido conservadas durante distintos periodos de tiempo en alcohol de 70°. Los resultados obtenidos revelaron la existencia de ciertas limitaciones en el uso de esta técnica en muestras conservadas en alcohol de 70°, especialmente en aquéllas que habían sido conservadas durante más de tres meses. De este modo, las muestras frescas constituían la mejor opción a la hora de utilizar MALDI-TOF MS en sifonápteros. Recientemente, Nebbak y col. (2017) utilizaron muestras de *C. felis* preservadas en distintos medios de conservación durante distintos periodos de tiempo para establecer una serie de protocolos previos de preparación y homogeneización de las muestras para su utilización en MALDI-TOF MS de forma óptima. Estos autores concluyeron que además de muestras frescas, aquéllas conservadas en alcohol de 70° o congeladas (-20° C) podían ser útiles también para realizar análisis de MALDI-TOF MS con resultados reproducibles. Por último, estos autores subrayaron la necesidad de aumentar la base de datos ya existente con nuevas especies, de modo, que se pueda establecer esta técnica proteómica como una herramienta útil, fiable y rápida para la identificación de sifonápteros.

I.2.6. Prevención y control

Aunque en ocasiones se considere a los sifonápteros como un grupo de insectos parásitos exclusivamente de animales y con poca trascendencia para la salud humana, no se debe obviar el estrecho contacto existente entre algunas especies del Orden Siphonaptera y los seres humanos. Como consecuencia de esta interacción, algunas especies son capaces de alimentarse por hematofagia de personas (*P. irritans*, *X. cheopis*, *N. fasciatus*), animales domésticos o del sector pecuario (*C. felis*, *C. canis*). A esta posibilidad de alteraciones patológicas, se debe añadir la amenaza que constituye la capacidad vectorial de todas ellas en la propagación de numerosos agentes patógenos que está provocando la reemergencia de algunas enfermedades transmitidas por pulgas o incluso la colonización de nuevas zonas geográficas y nuevos hospedadores por parte de numerosas especies, lo que se ve agravado por factores como el cambio climático o la deforestación medioambiental llevada a cabo por el hombre. Por todo ello, no es de extrañar que en los últimos dos años en nuestro país, se hayan notificado numerosos casos de plagas de pulgas en colegios o parques públicos tanto de zonas urbanas como rurales en diversas comunidades.

Respecto a los métodos usados en el control de sifonápteros, éstos son muy variados y la elección de uno u otro dependerá del contexto en el cual nos encontremos (Lewis, 1993). Uno de los problemas más frecuentes es la infestación de domicilios o edificios bien sean de ámbito público o privado, con pulgas provenientes de mascotas o animales de explotación ganadera. En el ámbito doméstico, el uso de insecticidas con fines profilácticos o de tratamiento de las mascotas junto con la higiene del entorno de las mismas, suele ser suficiente para prevenir la infestación en el interior de los edificios. En el entorno peridoméstico o silvestre, el método de elección más adecuado para el control puede variar de forma radical. Un claro ejemplo se encuentra en los

casos de la peste selvática, enfermedad endémica en algunas partes del mundo, y que constituye un problema para la salud humana en aquellas zonas donde el hombre comparte hábitat con los roedores que actúan como reservorio. En estas condiciones las dos formas de actuación recomendables son: controlar directamente las poblaciones de pulgas con insecticidas o bien controlar las poblaciones de estos roedores. En algunas zonas restringidas como parques de ciudades, colegios o instalaciones públicas, el control de los roedores suele ser la opción más fácil y menos costosa. En otras más amplias o menos localizadas, el tratamiento de elección variará según el medio que requiera la desinsectación. Así, en zonas de escasa vegetación donde las entradas a las madrigueras de estos roedores son visibles, se recomienda actuar con rodenticidas de acción crónica. Sin embargo, en zonas donde la vegetación u otros factores impidan localizar los refugios de estos roedores, se aconseja usar ceptos o trampas Sherman que hayan sido previamente tratadas con un insecticida adecuado de tal forma que mientras el roedor se alimenta del cebo de cada trampa quedará a su vez desprovisto de sus ectoparásitos (Lewis, 1993). De cualquier forma, siempre es conveniente la realización de estudios donde se determinen las especies de pulgas implicadas en la transmisión de una enfermedad determinada para evaluar la necesidad o no de un tratamiento y control.

I.3. BIBLIOGRAFÍA

Aburame, S. (2009) *Insects and humans*, Fire Editions, Konoha.

Aldrovandus, U. (1602) *De animalibus insectis libri septem, cum singulorum iconibus as vivum expressis*. Bologna.

Avisé, J.C. (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York, 511 pp.

Azad, A.F. y Beard, C.B. (1998) Rickettsial pathogens and their arthropod vectors, *Emerging Infectious Diseases*, 4: 179–86.

Baldo, B.A. (1993) Allergenicity of the cat flea. *Clinical and Experimental Allergy*, 23: 347–349.

Beaucournu, J.C. y Launay, H. (1990) Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental, Faune de France, Vol. 76. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris.

Bechah, Y., Capo, C., Mege, J.L. y Raoult, D. (2008) Epidemic typhus. *Lancet Infectious Diseases*, 8: 417–426.

Bernabeu-Wittel, M., del Toro, M.D., Noguerras, M.M., Muniain, M.A., Cardeñosa, N. y Márquez, F.J. (2006) Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25: 375–381.

Beutel, R.G. y Gorb, S.N. (2001) Evolution of locomotory attachment pads of hexapods. *Naturwissenschaften*, 88: 530–534.

Beutel, R.G., Friedrich, F., Hörschemeyer, T., Pohl, H., Hünefeld, F., Beckmann, F., Meier, R., Misof, B., Whiting, M.F. y Vilhemsen, L. (2011) Morphological and molecular evidence converging upon a robust phylogeny of the megadiverse Holometabola. *Cladistics*, 26: 1–15.

Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M.F. y Raoult, D. (2010) Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 14: 667–676.

Blanco, J.R. y Oteo, J.A. (2006) Rickettsiosis in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078: 28–33.

Blank, S.M., Kutzscher, C., Masello, J.F., Pilgrim, R.C. y Quillfeldt, P. (2007) Stick-tight fleas in the nostrils and below the tongue: evolution of an extraordinary infestation site in *Hectopsylla* (Siphonaptera: Pulicidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 149: 117–137.

Boudreaux, H.B. (1979) *Arthropod Phylogeny with special reference to insects*. New York: John Wiley.

Bybee, S.M., Zaspel, J.M., Beucke, K.A., Scott, C.H., Smith, B.W. y Branham, M.A. (2010) Are molecular data supplanting morphological data in modern phylogenetic studies? *Systematic Entomology*, 35: 2–5.

Carmean, D., Kimsey, L.S. y Berbee, M.L. (1992) 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 1: 270–278.

Chalwatzis, N., Hauf, J., Peer, Y.V.D., Kinzelbach, R. y Zimmerman, F.K. (1996) 18S ribosomal RNA genes of insects: Primary structure of the genes and molecular phylogeny of the Holometabola. *Annals of The Entomological Society of America*, 89: 788–803.

Chandra, S., Forsyth, M., Lawrence, A.L., Emery, D. y Šlapeta, J. (2017) Cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from cats and dogs in New Zealand: Molecular characterisation, presence of *Rickettsia felis* and *Bartonella clarridgeiae* and comparison with Australia. *Veterinary Parasitology*, 234: 25–30.

Chomel, B.B., Kasten, R.W., Williams, C., Wey, A.C., Henn, J.B., Maggi, R., Carrasco, S. y Mazet, J. (2009) *Bartonella* endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166: 120–126.

Croxatto, A., Prod'homme, G. y Greub, G. (2012) Applications of MALDI-TOF MS mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 380–407.

Dallai, R., Lupetti, P., Afzelius, B.A. y Frati, F. (2003) Sperm structure of Mecoptera and Siphonaptera (Insecta) and the phylogenetic position of *Boreus hyemalis*. *Zoomorphology*, 122: 211–220.

Dallai, R. (2009) The contribution of the sperm structure to the reconstruction of the hexapod phylogeny. *Procedures in Arthropod Embryology Society of Japan*, 43: 23–38.

Dampf, A. (1911) *Palaeopsylla klebsiana* n. sp. Ein fossiler Floh aus dem baltischen Bernstein. *Schriften der Physik.-ökonom. Gesellschaft zu Königsberg-i.-Pr, Ll.*, Jahrgang, II 248.

Dittmar, K. y Whiting, M.F. (2003) Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (*CytB* and *CoII*). *Parasitology Research*, 91: 55–59.

Dobler, G. y Pfeffer, M. (2011) Fleas as parasites of the family Canidae. *Parasite and Vectors*, 4: 139.

Dunnet, G.M. y Mardon, D.K. (1991) Siphonaptera. In: Naumann, P.B.C.I.D., Lawrence, J.F., Nielsen, E.S., Spradberry, J.P., Taylor, R.W., Whitten, M.J., Littlejohn, M.J. (Eds.), *Siphonaptera*. CSIRO and Melbourne Univ. Press, Melbourne, pp. 125–140.

Durden, L.A. y Traub, R. (2002) *Medical and veterinary entomology*. Ed. Elsevier. Science. 7: 103–125.

Eisen, R.J. y Gage, K.L. (2012) Transmission of flea-borne zoonotic agents. *Annual Review of Entomology*, 57: 61–82.

Fotso Fotso, A., Mediannikov, O., Diatta, G., Almeras, L., Flaudrops, C., Parola, P. y Drancourt, M. (2014) MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crocidurae/Ornithodoros sonrai* paradigm. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8: e2984.

Gamerschlag, S., Mehlhorn, H., Heukelbach, J., Feldmeier, H. y D’Haese, J. (2008) Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). *Parasitology Research*, 102: 193–199.

- Grimaldi, D. y Engel, M.S. (2005) *Evolution of the Insects*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hamilton, K.G.A. (1972) The insect wing, part III. Venation of the orders. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 45: 296–308.
- Hastriter, M.W. y Whiting, M.F. (2003) Siphonaptera (fleas). In: Resh, V.H., Carde, R. (Eds.), *Siphonaptera (fleas)*. Academic Press, New York, pp. 1094–1095.
- Hennig, W. (1969) “Die Stammesgeschichte der Insekten.” Frankfurt am Main, Germany.
- Hennig, W. (1981) “Insect Phylogeny.” Academic Press, New York.
- Hinton, H.E. (1958) The phylogeny of the Panorpoid orders. *Annual Review of Entomology*, 3: 181–206.
- Holland, G.P. (1964) Evolution, classification, and host relationships of Siphonaptera. *Annual Review of Entomology*, 9: 123–146.
- Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1953) *An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. I. Tungidae and Pulicidae*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1956) *An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. II. Coptopsyllidae, Vermipsyllidae, Stephanocircidae, Ischnopsyllidae, Hypsophthalmidae and Xiphopsyllidae*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1962) *An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. III. Hystrichopsyllidae*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1966) *An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. IV. Hystrichopsyllidae (Ctenophthalminae, Dinopsyllinae, Doratopsyllinae and Listroopsyllinae)*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hopkins, G.H.E., Rothschild, M. (1971) An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. V. Leptopsyllidae and Ancistropsyllidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hoppenheit, A., Murugaiyan, J., Bauer, B., Steuber, S., Clausen, PH. y Roesler, U. (2013) Identification of Tsetse (*Glossina* spp.) using matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7: e2305.

Karger, A., Kampen, H., Bettin, B., Dautel, H., Ziller, M., Hoffmann, B., Süss, J. y Klaus, C. (2012) Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole animal matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3: 78–89.

Kaufmann, C., Schaffner, F., Ziegler, D., Pfluger, V. y Mathis, A. (2012) Identification of fieldcaught Culicoides biting midges using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology*, 139: 248–258.

Keret, D., Giladi, M., Kletter, Y. y Wietroub, S. (1998) Cat scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 80-B: 766–767.

Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P.P., Hegarty, B., Tucker, M. y Breitschwerdt, E. (2008) Evaluation of conventional and realtime PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. *Veterinary Microbiology*, 129: 294–303.

Krasnov, B.R. (2008) Functional and Evolutionary Ecology of Fleas. Cambridge University Press, New York (United States of America).

Kristensen, N.P. (1975) The phylogeny of hexapod “orders”. A critical review of recent accounts. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 13: 1–44.

Kristensen, N.P. (1981) Phylogeny of the insect orders. *Annual Review of Entomology*, 26: 135–157.

Kristensen, N.P. (1999) Phylogeny of endopterygote insects, the most successful lineage of living organisms. *European Journal of Entomology*, 96: 237–253.

Lane, R.P. y Crosskey, R.W. (1993) Medical insects and arachnids. Ed. Chapman and Hall. 529–575.

Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, M. y Šlapeta, J. (2014) High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology*, 28: 330–336.

Lawrence, A.L., Hii, S.F., Jirsová, D. Panáková, L., Ionică, A.M., Gilchrist, K., Modrý, D., Mihalca, A.D., Webb, C.E., Traub, R.J. y Šlapeta, J. (2015) Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Veterinary Parasitology*, 210: 215–223.

Leulmi, H., Socolovschi, C., Laudisoit, A., Houemenou, G., Davoust, B., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P. (2014) Detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, *Bartonella* Species and *Yersinia pestis* in Fleas (Siphonaptera) from Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9; 8: e3152.

Lewis, R.E. (1993) Notes on the geographical distribution and host preferences in the Order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Journal of Medical Entomology*, 30: 239–256.

Lewis, R.E. y Grimaldi, D. (1997) A pulicid flea in Miocene amber from the Dominican Republic (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae). *American Museum Novitates*, 3205: 1–9.

Lewis, R.E. (1998) Resume of the Siphonaptera (Insecta) of the World. *Journal of Medical Entomology*, 35: 377–389.

Linardi, P.M. y Guimaraes, L.R. (1993) Systematic review of genera and subgenera of Rhopalopsyllinae (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae) by phenetic and cladistic methods. *Journal of Medical Entomology*, 30: 161–170.

Linardi, P.M. y Guimarães, L.R. (2000) Sifonápteros do Brasil. Museu de Zoologia USP/FAPESP, São Paulo, 291 pp.

Linnaeus, C. (1735) “Systema naturae, sive regna tria naturae systemat icaproposita per classes, ordines, genera et species, etc.” 1st ed.

- Linnaeus, C. (1738) “Systema naturae, sive regna tria naturae systematica proposita per classes, ordines, genera et species, etc.” 2nd ed.
- Lu, L. y Wu, H. (2003) A cladistic and biogeographic analysis of Chinese *Neopsylla Wagner* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae). *Invertebrate Systematics*, 17: 607–615.
- Luchetti, A., Mantovani, B., Pampiglione, S. y Trentini, M. (2005) Molecular characterization of *Tunga trimamillata* and *Tunga penetrans* (Insecta, Siphonaptera, Tungidae): taxonomy and genetic variability. *Parasite*, 12: 123–129.
- Luchetti, A., Trentini, M., Pampiglione, S., Fiorawanti, M.L. y Mantovani, B. (2007) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) and fleas across South America and Africa. *Parasitology Research*, 100: 593–598.
- Lukashevich, E.D. y Mostovsky, M.B. (2003) Haematophagous insects in the fossil record. *Paleontologicheskyy Zhurnal*, 37: 48–56.
- Machida, R. (2006) Evidence from embryology for reconstructing the relationships of basal hexapod clades. *Arthropod Systematic Phylogeny*, 64: 95–104.
- Maco, V., Tantaleán, M. y Gotuzzo, E. (2011) Evidence of tungiasis in pre-Hispanic America. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 855–862.
- Maleki-Ravasan, N., Solhjoui-Fard, S., Beaucournu, J.C., Laudisoit, A. y Mostafavi, E. (2017) The Fleas (Siphonaptera) in Iran: Diversity, Host Range, and Medical Importance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11: e0005260.
- Mardon, D.K. (1981) An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. VI. Pygiopsyllidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Márquez, F.J., Muniain, M.A., Rodríguez-Liebana, J.J., Del Toro, M.D., Bernabeu-Wittel, M. y Pachón, A.J. (2006) Incidence and distribution pattern of *Rickettsia felis* in peridomestic fleas from Andalusia, Southeast Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078: 344–346.
- Márquez, F.J., Millán, J., Rodríguez-Liebana, J.J., García-Egea, I. y Muniain, M.A. (2009) Detection and identification of *Bartonella* sp. in fleas from carnivorous mammals in Andalusia, Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 23: 393–398.

Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. y Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research*, 112: 2289–2298.

Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., Garijo, M., Martínez, J., Alonso, F.D. y de Ybáñez, R.R. (2007) Epidemiological study of non-systemic parasitism in dogs in southeast Mediterranean Spain assessed by coprological and post-mortem examination. *Zoonoses and Public Health*, 54: 195–203.

McKenna, D.D. y Farrell, B.D. (2010) 9-genes reinforce the phylogeny of holometabola and yield alternate views on the phylogenetic placement of Strepsiptera. *PLoS One*, 5: e11887.

McKern, J.A., Szalanski, A.L., Austin, J.W. y Gold, R.E. (2008) Genetic diversity of field populations of the cat flea, *Ctenocephalides felis*, and the human flea, *Pulex irritans*, in the South Central United States. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 25: 259–263.

Medvedev, S.G. (1994) Morphological basis of the classification of flea (Siphonaptera). *Entomological Review*, 73: 30–51.

Medvedev, S.G. (1998) Classification of fleas (Order Siphonaptera) and its theoretical foundations. *Entomological Review*, 78: 1080–1093.

Medvedev, S.G. (2001a) An attempt to create a database of the morphology of fleas (Siphonaptera). *Entomological Review*, 81: 511–519.

Medvedev, S.G. (2001b) On the structure of cephalic ctenidia in fleas (Siphonaptera). *Entomological Review*, 81: 1117–1135.

Mencke, E. (2013) Future challenges for parasitology: vector control and 'One health' in Europe: the veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 195: 256–271.

Mogollon-Pasapera, E., Otvos, L. Jr., Giordano, A. y Cassone, M. (2009) *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? *International Journal of Infectious Diseases*, 13: 3–8.

Mora, 2005. Caracterización molecular y estudio filogenético de ácaros endoparásitos de la familia Rhinonyssidae (Tesis Doctoral). Sevilla: Universidad de Sevilla.

Müller, P., Pflüger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F. y Lengeler, C. (2013) Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS One*, 8: e57486.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*, 10: 263–273.

Nebbak, A., El Hamzaoui, B., Berenger, J.M., Bitam, I., Raoult, D., Almeras, L. y Parola, P. (2017) Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. *Medical and Veterinary Entomology*, 31: 438–448.

Niehuis, O., Hartig, G., Grath, S., Pohl, H., Lehmann, J., Tafer, H., Donath, A., Krauss, V., Eisenhardt, C., Hertel, J., Petersen, M., Mayer, C., Meusemann, K., Peters, R.S., Stadler, P.F., Beutel, R.G., Bornberg-Bauer, E., McKenna, D.D. y Misof, B. (2012) Genomic and morphological evidence converge to resolve the enigma of Strepsiptera. *Current Biology*, 22: 1039–1313.

Pape, T., Bickel, D. y Meier, R. (2009) *Diptera Diversity: Status, Challenges, and Tools*. Brill Academic Publishers, Leiden.

Pashley, D.P., McPheron, B.A. y Zimmer, E.A. (1993) Systematics of the holometabolous insect orders based on 18S ribosomal RNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2: 132–142.

Peters, R.S., Meusemann, K., Petersen, M., Mayer, C., Wilbrandt, J., Ziesmann, T., Donath, A., Kjer, K.M., Aspöck, U., Aspöck, H., Aberer, A., Stamatakis, A., Friedrich, F., Hünefeld, F., Niehuis, O., Beutel, R.G. y Misof, B. (2014) The evolutionary history of holometabolous insects inferred from transcriptome-based phylogeny and comprehensive morphological data. *BMC Evolutionary Biology*, 14: 52.

Peus, F. (1968) Über die beiden Bernstein-Fohe (Insecta, Siphonaptera). *Paleontol. Zh.*, 42: 62–72.

- Ponomarenko, A.G. (1986) Scarabaeiformes incertae sedis. In: Rasnitsyn, A.P. (Ed.) Transactions of the Joint Soviet-Mongolian Paleontological Expedition, pp. 110–112.
- Predel, M., Roth, S., Neupert, S. y Picker, M. (2005) New insect order Mantophasmatodea: Species differentiation by mass fingerprints of peptide hormones? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43: 149–156.
- Psaroulaki, A., Chochlakis, D., Ioannou, I., Angelakis, E. y Tselentis, Y. (2014) Presence of *Coxiella burnetii* in fleas in Cyprus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 14: 685–687.
- Rasnitsyn, P. (1992) *Strashila Incredibilis*, a New Enigmatic Mecopteroide Insect With Possible Siphonapteran Affinities From the Upper Jurassic of Siberia. *Psyche*, 99: 323–333.
- Ray, J. (1710) “Historia insectorum; opus posthumum. Cui subjungitur appendix de Scarabaeis Britannicus auctore M. Lister.” London.
- Reif, K.E. y Macaluso, K.R. (2009) Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *Journal of Medical Entomology*, 46: 723–736.
- Riek, E.F. (1970) Lower Cretaceous Fleas. *Nature*, 227: 746–747.
- Ross, H.H. (1973) Evolution and phylogeny. History of Entomology (ed. by R.F. Smith, T.E. Mittler and C.N. Smith), pp. 171–184. Annual Reviews Inc., Palo Alto.
- Rothschild, M. (1975) Recent advances in our knowledge of the Order Siphonaptera. *Annual Review of Entomology*, 20: 241–259.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termoestable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Seng, P., Rolain, J.M., Fournier, P.E., La Scola, B., Drancourt, M. y Raoult, D. (2010) MALDI-TOF mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology*, 5: 1733–1754.
- Singhal, N., Kumar, M. y Viridi, J.S. (2016) MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology*, 143: 1491–1500.

Smit, F.G.A.M. (1987) An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History). Oxford University Press, Oxford.

Soulsby, E.J.L. (1982) Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7th Edition, Baillier, Tindall, London.

Tillyard, R.J. (1935) The evolution of the scorpion-flies and their derivatives (Order Mecoptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 28: 1–45.

Traub, R. y Starcke, H. (1980) Fleas: Proceedings of the international conference on fleas. A.A. Balkema, Rotterdam.

Traub, R., Rothschild, M. y Haddow, J.F. (1983) The Ceratophyllidae, Key to the Genera and Host Relationships. Academic Press, New York.

Trautwein, M.D., Wiegmann, B.M., Beutel, R., Kjer, K.M. y Yeates, D.K. (2012) Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annual Review of Entomology*, 57: 449–468.

Tsukahara, M., Tsuneoka, H., Lino, H., Ohno, K. y Murano, I. (1998) *Bartonella henselae* infection from a dog. *Lancet*, 352: 1682.

Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagburn, B.L., Bond, R., Denholm, I., Dryden, M.W., Payne, P., Rust, M.K., Schroeder, I., Vaughn, M.B. y Bledsoe, D. (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, 94: 219–226.

Welker, M. y Moore, E.R. (2011) Applications of whole cell matrix assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 211.

Wheeler, W.C., Whiting, M., Wheeler, Q.D. y Carpenter, J.M. (2001) The Phylogeny of the Extant Hexapod Orders. *Cladistics*, 17: 113–169.

Whiting, M.F., Carpenter, J.C., Wheeler, Q.D. y Wheeler, W.C. (1997) The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology*, 46: 1–68.

Whiting, M.F. (2002a) Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. XXI International Congress of Entomology, Iguassu Falls, Brazil, August 2000. *Zoologica Scripta*, 31: 3–15.

Whiting, M.F. (2002b) Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica Scripta*, 31: 93–104.

Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W. y Dittmar, K. (2008) A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*, 24: 677–707.

Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Kim, J.W., Cassel, B.K., Bertone, M.A., Winterton, S.L. y Yeates, D.K. (2009) Single-copy nuclear genes resolve the phylogeny of the holometabolous insects. *BMC Biology*, 7: 34.

Yssouf, A., Socolovschi, C., Leulmi, H., Kernif, T., Bitam, I., Audoly, G., Almeras, L., Raoult, D. y Parola, P. (2014) Identification of flea species using MALDITOF/MS. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37: 153–157.

Yssouf, A., Almeras, L., Terras, J., Socolovschi, C., Raoult, D. y Parola, P. (2015) Detection of *Rickettsia* spp in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9: e0003473.

Zhang, Y., Dai, X., Wang, Q., Chen, H., Meng, W., Wu, K., Luo, T., Wang, X., Rehemu, A., Guo, R., Yu, X., Yang, R., Cao, H., Song, Y. (2015) Transmission efficiency of the plague pathogen (*Y. pestis*) by the flea, *Xenopsylla skrjabini*, to mice and great gerbils. *Parasites and Vectors*, 8: 256.

Zhu, Q., Hastriter, M.W., Whiting, M.F. y Dittmar, K. (2015) Fleas (Siphonaptera) are Cretaceous, and evolved with Theria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 90: 129–139.



CAPÍTULO II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. GENERALES

1. El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido llevar a cabo un estudio taxonómico y filogenético de diferentes especies del Orden Siphonaptera parásitas de distintos hospedadores que habitan distintas zonas geográficas: Andalucía, norte de África, Baleares, Islas Canarias, Irán, Isla de Córcega, Francia Occidental, Bélgica, Argentina y Sudáfrica con el fin de dilucidar la complicada taxonomía actual de este grupo de insectos y aportar nuevos datos epidemiológicos para su lucha y control. Para ello se han utilizado técnicas morfológicas, biométricas, moleculares y la técnica proteómica MALDI-TOF MS.
2. El segundo objetivo ha sido evaluar la presencia/ausencia y prevalencia de distintos agentes patógenos en las especies de sifonápteros estudiadas con el objetivo de aportar nuevos datos epidemiológicos que nos ayuden a identificar nuevos métodos de control y lucha en el futuro próximo.

II.2. ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos han sido:

1. Estudio taxonómico

Realizar un estudio taxonómico del Orden Siphonaptera a distintos niveles: Familia, género, especie y subespecie. Este estudio se ha llevado a cabo en tres fases:

- a) Mediante técnicas clásicas basadas en caracteres morfológicos y biométricos.
- b) Mediante técnicas moleculares basadas en la amplificación y secuenciación de marcadores del ADN ribosómico (gen 18S parcial y Espaciadores Internos

Transcritos 1 y 2) y del ADN mitocondrial (gen parcial de la citocromo oxidasa subunidad 1 y gen parcial de la citocromo b).

c) Mediante la técnica MALDI-TOF MS, con el fin de obtener espectros únicos y característicos para cada especie estudiada, además de permitirnos ampliar una base de datos de referencia con la cual identificar y clasificar distintas especies y subespecies dentro de este Orden.

2. Estudio filogenético

a) Realizar un estudio filogenético entre las distintas familias, géneros, especies y subespecies del Orden Siphonaptera, evaluando la utilidad de los cinco marcadores moleculares utilizados como marcadores válidos a la hora de establecer relaciones filogenéticas a distintos niveles taxonómicos.

b) Determinar los valores de similitud genéricos, específicos y subespecíficos de pulgas basándonos en las secuencias obtenidas a partir de los cinco marcadores moleculares utilizados.

3. Detección de agentes patógenos

a) Detectar la presencia de bacterias patógenas y simbioses mediante la amplificación de marcadores moleculares ribosómicos y mitocondriales específicos en las distintas poblaciones de sifonápteros estudiadas mediante las técnicas de PCR estándar y PCR en tiempo real (qPCR) con el fin de aportar nuevos datos epidemiológicos útiles para la prevención y control de posibles enfermedades transmitidas por pulgas.

b) Comparar los espectros obtenidos entre muestras infectadas y no infectadas por diversos patógenos, con el objetivo de obtener posibles espectros de referencia que nos permitan definir el estatus infeccioso de las muestras.



CAPÍTULO III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

En la presente Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo 1) un estudio taxonómico basado en datos morfológicos, biométricos, moleculares y proteómicos, 2) un estudio filogenético mediante la amplificación y secuenciación de genes y fragmentos del ADN mitocondrial y del ADN ribosómico y 3) la detección de patógenos mediante técnicas moleculares cuantitativas y la técnica MALDI-TOF MS de distintas especies del Orden Siphonaptera parásitas de diversos hospedadores de distintas zonas geográficas. Las especies estudiadas han sido: *Stenoponia tripectinata*, *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Nosopsyllus barbarus*, *Nosopsyllus fasciatus*, *Archaeopsylla erinacei* y *Pulex irritans* (Tabla 1).

III.1. TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE DIVERSAS ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA: ESTUDIOS MORFOLÓGICOS, BIOMÉTRICOS Y MOLECULARES

III.1.1. *Stenoponia tripectinata* (Zurita y col., 2015)

El estudio se llevó a cabo en ejemplares aislados de la especie *Mus musculus* procedentes de algunas de las islas que conforman el archipiélago canario (Gran Canaria, La Palma, El Hierro, Tenerife y La Gomera) (Anexo I, tabla 1) (Figura 12).



Figura 12: Distribución geográfica y hospedadores de *S. tripectinata*.

La identificación morfológica de esta especie se basó en la presencia de tres ctenidios: uno genal caracterizado por la ausencia de dientes posteriores perpendiculares al frontal de la cabeza, uno pronotal localizado en el protórax y un peine abdominal situado en el tergito I. Otra característica morfológica de esta especie fue la presencia de un ojo vestigial no pigmentado. No se observaron diferencias morfológicas entre los

especímenes estudiados procedentes de las islas mencionadas anteriormente, así, todos los especímenes estudiados presentaron características morfológicas típicas de la subespecie *S. t. tripectinata*.

La caracterización molecular de la subespecie *S. t. tripectinata* se basó en la amplificación y secuenciación de los fragmentos ITS1 e ITS2, el gen parcial 18S del ADNr y el gen parcial *cox1* del ADN mitocondrial (ADNmt).

La longitud total de las secuencias del ITS1 obtenidas osciló entre 1204 y 1209 pares de bases (pb), mientras que esta longitud fue marcadamente menor para las secuencias del ITS2 (332 pb). Por otro lado, la longitud total de las secuencias de los genes parciales 18S y *cox1* oscilaron entre 1095 y 1098 pb para el primero y 677 pb para el segundo. El cálculo de los porcentajes de similitud intraindividual reveló unos valores comprendidos entre el 99,6 % y el 100 % para el ITS1 y entre el 99,7 % y el 100 % para el ITS2. Por otra parte, basándonos en estos marcadores, los porcentajes de similitud intrapoblacional (entendiéndose como población los ejemplares recolectados de una misma zona geográfica) e interpoblacional observados fueron muy similares, oscilando siempre entre el 98,9 % y el 100 %. Respecto al gen parcial 18S, no se observaron diferencias nucleotídicas entre ninguna de las secuencias obtenidas, inclusive cuando los especímenes procedían de diferentes islas. Se compararon las secuencias del gen 18S obtenidas con las de otras especies del mismo género (*Stenoponia sidimi* y *Stenoponia americana*) obteniéndose unos porcentajes de similitud cercanos al 100 % (99,8 % y 99,9 %, respectivamente). Por último, el análisis de las secuencias del gen *cox1* reveló unos porcentajes de similitud intrapoblacional e interpoblacional que oscilaron siempre entre el 99,6 % y el 100 %. Adicionalmente, se compararon las secuencias del gen parcial *cox1* de las distintas poblaciones de las islas con aquellas secuencias obtenidas de la base de datos GenBank correspondientes a

especímenes de *S. t. tripectinata* procedentes de la Península Ibérica. Los valores de similitud interpoblacional, aunque ligeramente inferiores, siguieron cercanos al 100 % (98,9 %-99,7 %). Este marcador nos permitió elaborar un mapa de restricción de ambas poblaciones (peninsular y canaria) con tres endonucleasas (*MseI*, *AseI* y *VspI*) capaces de identificar ambas poblaciones por medio de la técnica de PCR-RFLP (PCR ligada a enzimas de restricción).

Los resultados filogenéticos obtenidos para esta especie variaron en función del gen objeto de estudio. En primer lugar, no se pudo llevar a cabo un análisis filogenético en base a los marcadores ITSs ya que no se encontraron grupos externos adecuados para ello. Con respecto al gen 18S, todas las especies analizadas pertenecientes al género *Stenoponia* (*S. tripectinata*, *S. sidimi* y *S. americana*) se encontraron agrupadas en un clado exclusivo, dentro del cual no se observaba un patrón de distribución geográfico específico para *S. tripectinata*. Además, este clado aparecía estrechamente relacionado con las especies pertenecientes a las familias Leptopsyllidae y Ceratophyllidae. A diferencia del gen 18S, el árbol filogenético basado en el gen parcial *cox1* mostró dos linajes genéticos claramente diferenciados dentro de la especie *S. tripectinata*, correspondientes a la Península Ibérica y al archipiélago canario, aunque dentro de este último no se observó un patrón concreto de distribución geográfica entre las diferentes islas estudiadas. Además, en este caso todas las especies pertenecientes al género *Stenoponia* formaron un clado compacto con altos valores de soporte de rama, filogenéticamente separado y en politomía con el resto de familias analizadas (Ctenophthalmidae, Pygiopsillidae y Pulicidae).

III.1.2. *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis* (Zurita y col., 2016a)

El estudio de estas especies se ha llevado a cabo en especímenes aislados de perros (*Canis lupus familiaris*) procedentes de diferentes zonas geográficas (Anexo I, tabla 1) (Figura 13). Se llevó a cabo un estudio morfológico comparativo basado en los caracteres diferenciales descritos para ambas especies, que revelaron claras diferencias entre *C. canis* y *C. felis*. Estos caracteres fueron los siguientes:

- Presencia de un ctenidio genal compuesto de ocho o nueve dientes orientados horizontalmente. Los especímenes clasificados como *C. canis* mostraron un primer diente genal mucho menor en comparación con el segundo, mientras que para *C. felis* tenían una longitud similar.
- Forma del frontal de la cabeza y relación longitud/anchura de la misma. En *C. felis* la cabeza de la hembra se presentó aproximadamente dos veces más larga que ancha, mientras que esta relación era menor en el caso de los machos. Por su parte, en *C. canis* la zona frontal de la cabeza presentaba una forma fuertemente convexa.
- Número de espinas presentes en el metanoto. Es característico de la especie *C. felis* la presencia de dos espinas en el metanoto mientras que en *C. canis* este número aumenta hasta tres espinas.
- Número variable de espinas entre la espina apical y post-medial de la tibia III. Todos los individuos estudiados clasificados como *C. felis* presentaron una espina simple, corta y fuerte acompañada de una pequeña seta, a veces ausente, muy cercana a la misma, mientras que en *C. canis* se observaron dos espinas simples, bien desarrolladas y fuertes, entre la seta post-medial y la apical.

- El grado de dilatación presente en el ápex del manubrio en los machos. Mientras que los machos de *C. felis* no mostraron ningún tipo de dilatación en esta estructura, este hecho sí fue observado en los machos clasificados como *C. canis*, donde se observó una clara dilatación en la zona apical del ápex del manubrio.
- El grado de elongación de la zona apical del hilla de la espermateca en las hembras. En las hembras de *C. felis* la espermateca se observó en la parte posterior y presentaba forma arrañada, sin elongación en la zona apical del hilla, mientras que en el caso de las hembras de *C. canis* la parte apical del hilla de la espermateca estaba elongada.

Al analizar nuestros resultados, se observó que algunos individuos clasificados como *C. felis* mostraban características morfológicas propias de la especie *C. canis* tales como la presencia de dos espinas cortas y fuertes situadas entre la seta post-medial y la seta apical de la tibia III, así como la presencia de 3 espinas en el área lateral del metanoto, en al menos uno de los lados del cuerpo.

Para llevar a cabo la caracterización molecular de ambas especies se secuenciaron los fragmentos ITS1 e ITS2 del ADNr, el gen parcial 18S del ADNr y el gen parcial *cox1* del ADNmt. El estudio de los datos moleculares obtenidos mostró una longitud total de 989 pb para las secuencias correspondientes al gen parcial 18S, no observándose diferencias entre especímenes de distintos orígenes geográficos ni entre especímenes de ambas especies. En cuanto al estudio del ITS1 (668 pb), no se observaron diferencias intrapoblacionales ni interpoblacionales en ambas especies; sin embargo, el porcentaje de similitud interespecífica observado entre ellas fue del 91,9 %. Por su parte, las secuencias correspondientes al fragmento ITS2 (327 pb) de ambas especies revelaron un porcentaje de similitud interespecífica de 96,3 %, inferior al

porcentaje intrapoblacional e interpoblacional observado que osciló entre el 99,9 % y el 100 % para ambas especies. Por último, también se estudió la variabilidad intraindividual en un número variable de clones de un mismo espécimen tanto para *C. felis* como para *C. canis*, obteniéndose valores que oscilaron entre un 100 % y un 99,1 %-100 %, respectivamente. Los resultados moleculares más destacables de este estudio fueron aquéllos observados para el gen parcial *cox1* (600 pb). Dentro de los individuos clasificados como *C. canis* no se observó diferencia alguna en las secuencias de este marcador; mientras que, en los individuos caracterizados como *C. felis* se identificaron 5 haplotipos distintos (A, A1, A2, B y C). El haplotipo A fue el más prevalente y mostró un porcentaje de similitud con *C. canis* del 97,7 %. Sorprendentemente este porcentaje fue muy parecido al observado entre los haplotipos A-B y A-C, mientras que el observado entre *C. canis*-B y *C. canis*-C osciló entre el 99,3 % y el 99,7 %. Para la detección de la variación interespecífica para este gen, se llevó a cabo un estudio comparativo entre secuencias de diferentes especies del género *Ctenocephalides* usando adicionalmente secuencias obtenidas en estudios previos (Lawrence y col., 2014, 2015). Estos análisis mostraron que los menores porcentajes de similitud se obtuvieron al comparar las especies *Ctenocephalides orientis* y *C. canis* (República Checa) con el resto de especies del género. Usando el marcador molecular *cox1* también se elaboró un mapa de restricción con un número variable de endonucleasas (*SacI*, *SstI*, *TaqI*, *DraI*, *BclI*, *HpaII* y *MspI*) que por medio de la técnica PCR-RFLP eran capaces de identificar los diferentes haplotipos de la especie *C. felis* (A, A1, A2, B y C), así como entre estos mismos y *C. canis*.

Para los estudios filogenéticos llevados a cabo sobre las especies *C. felis* y *C. canis*, se utilizaron como marcadores moleculares los genes 18S ADNr y *cox1* ADNmt. El árbol filogenético basado en el gen ribosómico 18S agrupó en politomía a todas las especies

analizadas pertenecientes a la familia Pulicidae, incluyendo *C. felis* y *C. canis*, que conformaban un clado independiente donde no se observaron señales filogenéticas en función de la especie o la zona geográfica de origen.

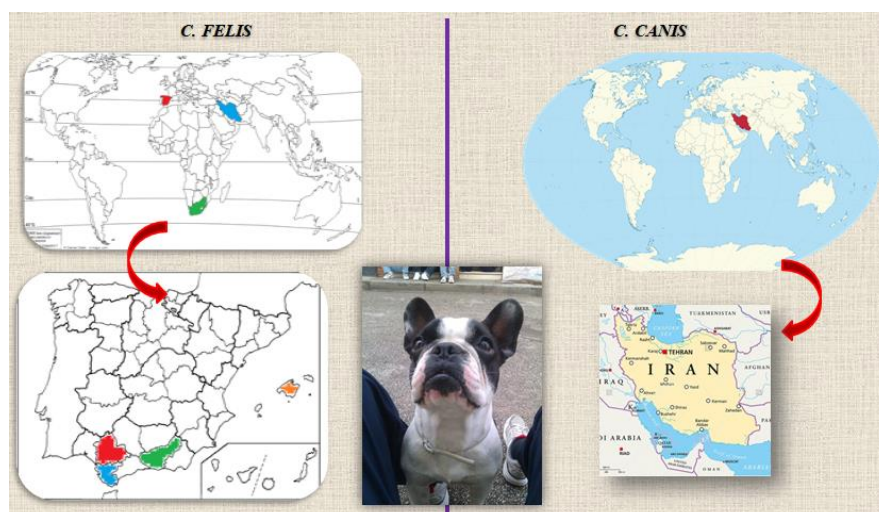


Figura 13: Esquema de las zonas geográficas muestreadas para las especies *C. felis* y *C. canis*

Tanto el árbol filogenético basado en el gen *cox1* como el concatenado de ambos genes (18S y *cox1*) mostraron los mismos resultados. Así, todas las especies pertenecientes al género *Ctenocephalides* aparecían filogenéticamente separadas del resto de especies de la familia Pulicidae, formando un clado compacto con altos valores de soporte de rama. Dentro de este clado aparecieron a su vez tres subclados claramente diferenciados. En el primero de ellos se agrupaban individuos pertenecientes a las especies *C. orientis* y *C. canis* (especímenes aislados de la República Checa). En el segundo se agruparon individuos perteneciente a *C. canis* de Irán, *C. felis* aislados de Queensland, Cairns (Australia) y *C. felis* haplotipos B (sur de España) y C (Sudáfrica). Por último, el tercer clado agrupó a los haplotipos A, A1 y A2 (sur de España e Irán) de *C. felis* además de individuos de la misma especie procedentes de distintas regiones de las islas Fiji, Tailandia, India, República Checa y Australia. Las redes de mínima expansión confirmaron los resultados filogenéticos obtenidos con la presencia de tres

grupos principales claramente diferenciados y correspondientes a los tres subclados observados dentro del género *Ctenocephalides*.

III.1.3. *Nosopsyllus barbarus* y *Nosopsyllus fasciatus* (Zurita y col., 2018a)

El objetivo de este estudio fue realizar un análisis taxonómico clásico y molecular de las especies *N. barbarus* y *N. fasciatus* aisladas de roedores procedentes de diversas áreas geográficas (España, Marruecos, Bélgica, Francia y Portugal) (Figura 14) con el fin de evaluar y clarificar el estatus taxonómico de ambas especies (Anexo I, tabla 1). Todos los individuos estudiados mostraron caracteres morfológicos típicos del género *Nosopsyllus*. A su vez, todos los individuos procedentes de Francia, Bélgica y Portugal (Islas Azores) mostraron características morfológicas típicas de la especie *N. fasciatus*, mientras que los especímenes procedentes de España y Marruecos fueron clasificados como *N. barbarus*. La diferenciación morfológica de los machos resultó bastante difícil debido a la ausencia de caracteres diferenciales claros y al solapamiento de los mismos. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en el caso de las hembras. Las hembras de *N. fasciatus* se caracterizaron por presentar el margen posterior del esternito VII casi recto acabando en ángulo de noventa grados con el margen ventral, mientras que, las hembras de *N. barbarus* presentaban un margen posterior en el esternito VII con una incrasación pronunciada formando un lóbulo apical de tamaño variable.

Para la caracterización molecular se utilizaron como marcadores moleculares los fragmentos ITS1 e ITS2 del ADN ribosómico, el gen parcial 18S del ADNr y los genes parciales *cox1* y *cytb* del ADNmt. No se observaron diferencias nucleotídicas en todas las secuencias obtenidas del gen 18S (1153 pb), exceptuando un espécimen de Granada (España) que mostró una mutación en la posición 563. Respecto a los fragmentos ITS1

(1100 pb) e ITS2 (318 pb) la similitud intraindividual observada en ambos marcadores osciló entre el 99,1 % y el 100 % cuando se analizaron 10 clones de cada especie.

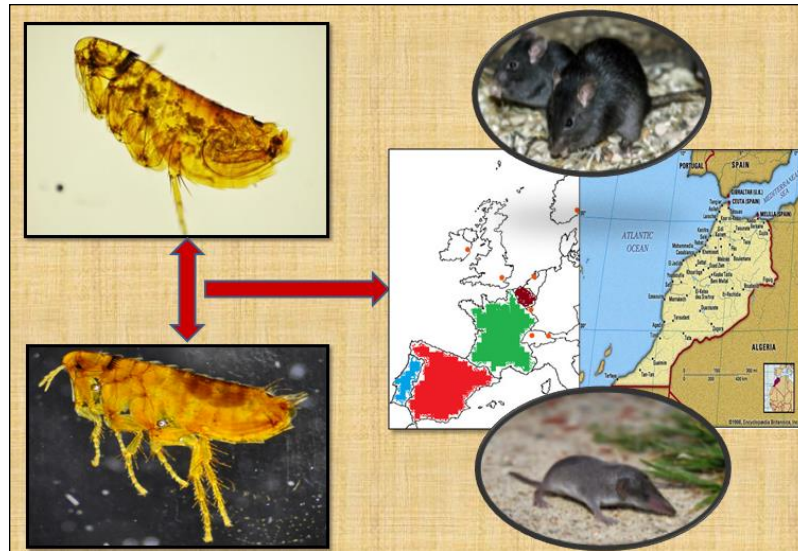


Figura 14: Distribución geográfica y hospedadores de *N. fasciatus* y *N. barbarus*.

No se observaron diferencias nucleotídicas intrapoblacionales, interpoblacionales e interespecíficas en todas las secuencias ITS2, mientras que para el fragmento ITS1, el porcentaje de similitud tanto a nivel intrapoblacional, interpoblacional como interespecífico nunca fue inferior al 99,4 %. Cuando se analizaron las secuencias obtenidas de los marcadores moleculares mitocondriales *coxI* (658 pb) y *cytb* (374 pb) los valores de similitud observados fueron más bajos que los obtenidos para los fragmentos ITS, así, éstos oscilaron entre el 95,0 % y el 100 % solapándose entre los distintos niveles estudiados (intrapoblacional, interpoblacional e interespecífico). Además, basándonos en ambos marcadores mitocondriales, se llevó a cabo un estudio molecular comparativo con otras subespecies congénicas como *Nosopsyllus laeviceps ellobii*, *Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi* y *Nosopsyllus iranusi theodori* mostrando porcentajes de similitud interespecífica bastante más bajos que oscilaban entre un 84,6 % y un 88,5 %.

Para llevar a cabo el estudio filogenético de ambas especies congénicas, se realizó un análisis de las secuencias concatenadas de los genes 18S, *cox1* y *cytb*. El árbol filogenético resultante reveló la existencia de dos clados principales soportados por altos valores de soporte de rama. En el primero, se agruparon todos los individuos pertenecientes a la familia Pulicidae, mientras que en el segundo aparecían todos los individuos pertenecientes a las especies *N. fasciatus* y *N. barbarus* (Ceratophyllidae) junto con otras especies pertenecientes a las familias Ceratophyllidae, Leptopsyllidae e Ischnopsyllidae. Dentro de este último clado se observaron dos subclados bien diferenciados apareciendo en el primero todas las especies del género *Nosopsyllus* agrupadas sin ningún tipo de patrón a nivel de especie, hospedador o zona geográfica, mientras que en el segundo se agrupaban el resto de especies pertenecientes a la familia Ceratophyllidae y aquellas pertenecientes a las familias Leptopsyllidae e Ischnopsyllidae.

III.1.4. *Archaeopsylla erinacei* (Zurita y col., 2018b)

Se ha llevado a cabo por primera vez un estudio morfológico, biométrico y molecular de la especie *A. erinacei* y sus dos subespecies *Archaeopsylla erinacei maura* y *Archaeopsylla erinacei erinacei* aislada de erizos (*Erinaceus europaeus*) de diferentes zonas geográficas (Sevilla y Córcega) con el fin de evaluar y analizar las relaciones taxonómicas y filogenéticas entre ambas subespecies y así aclarar la sistemática de esta especie (Figura 15).

Basándonos en las características morfológicas diferenciales para los machos (longitud total del basímero) descritas por Jordan y Rothschild (1912, 1953) y Beaucournu y Launay (1990), observamos que todos los machos aislados de Sevilla,

presentaban características morfológicas típicas de *A. e. maura*, mientras que aquéllos aislados de Córcega presentaban características morfológicas típicas de *A. e. erinacei*.

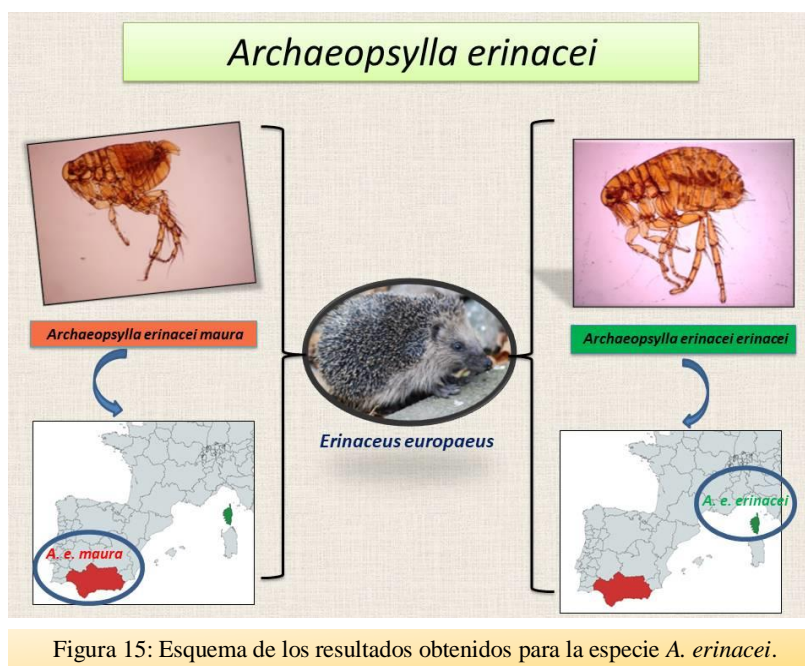


Figura 15: Esquema de los resultados obtenidos para la especie *A. erinacei*.

En relación con las hembras y basádonos en las características morfológicas diferenciales descritas con anterioridad para este sexo (número y distribución de setas en el esternito VII y el tergito VIII), no apareció ninguna concordancia entre el origen geográfico y la subespecie. Así, tres poblaciones o unidades taxonómicas operacionales (OTUs) fueron descritas (A, B y C). La población A englobaba a todas las hembras que presentaban en el tergito VIII dos espinas fuertes en ambos lados del cuerpo y la presencia en el esternito VII de cinco setas laterales (tres a un lado del cuerpo y dos al otro lado). Las hembras de la población B por su parte presentaron solo una espina lateral en el tergito VIII además de cinco setas laterales en el esternito VII (tres a un lado del cuerpo y dos al otro lado). Por último, la población C englobó a las hembras que presentaron sólo una espina lateral en el tergito VIII junto con seis setas laterales (tres a un lado del cuerpo y tres al otro lado) en el esternito VII. Mientras que las poblaciones A y B fueron observadas tanto en Sevilla como en Córcega, la población C

sólo se observó en Sevilla. Además de la diferencia en la longitud total del basímero entre los machos de *A. e. maura* y *A. e. erinacei*, los resultados biométricos mostraron que la longitud total de la espermateca de las hembras de Sevilla era considerablemente superior a la de la espermateca de las hembras de Córcega independientemente del OTU al cual pertenecieran.

El test estadístico ANOVA confirmó la existencia de diferencias morfológicas significativas ($P < 0,05$) entre los individuos (machos y hembras) de *A. erinacei* de Sevilla y Córcega. Así, estas fueron observadas en la anchura total de la cabeza y la longitud total de la espermateca en las hembras, mientras que estas diferencias fueron significativas en la longitud total del cuerpo, la longitud total de la cabeza, la longitud y anchura total del basímero, y la longitud total del metatórax de los machos.

Para llevar a cabo la caracterización molecular de ambas subespecies, se utilizaron como marcadores moleculares los fragmentos ITS1 e ITS2 y el gen parcial 18S del ADNr además de los genes parciales *cox1* y *cytb* del ADNmt. Todas las secuencias obtenidas del gen 18S fueron idénticas (1160 pb), independientemente de la clasificación morfológica del espécimen o el origen geográfico del mismo. Las secuencias del ITS1 obtenidas tuvieron una longitud entre 949-950 pb para los especímenes obtenidos de Sevilla mientras que la longitud de dicho fragmento para aquéllos aislados de Córcega fue de 951 pb. Para el ITS2 también se observaron diferencias de longitud entre las secuencias obtenidas en función del origen geográfico (361 pb para individuos de Sevilla y 360 pb para individuos de Córcega). Esta diferencia fue confirmada con el estudio de clones procedentes de un individuo de ambos orígenes geográficos y fue debida a una base extra situada en la posición 258. El porcentaje de similitud intraindividual para los clones del fragmento ITS2 osciló entre un 99,2 % y un 100 %. Dentro de los individuos de un mismo origen geográfico no se

observaron diferencias para ninguno de los ITSs estudiados; independientemente del OTU al que perteneciesen en el caso de las hembras. Por otro lado, a nivel interpoblacional, los porcentajes de similitud para el ITS1 oscilaron entre un 99,1 % y un 100 %, mientras que para el ITS2 se obtuvo un valor más bajo (96,9 %). Los mapas de restricción obtenidos para ambos marcadores indicaron que los especímenes de Sevilla y Córcega podían ser fácilmente distinguidos mediante la amplificación de las secuencias del ITS1 e ITS2 y posterior digestión con diversas enzimas de restricción (PCR-RFLP). Así, por ejemplo, para el ITS1, las enzimas *EcoRV*, *HaeIII* y *PhoI* presentaron un sitio de corte específico en *A. erinacei* aislada de Sevilla, mientras que en el caso del ITS2, las enzimas *AseI*, *MseI* y *VspI* presentaron un sitio de corte específico en *A. erinacei* aislada de Córcega.

Por otro lado, el estudio de los genes parciales mitocondriales *cox1* (658 pb) y *cytb* (374 pb) reveló un porcentaje de variabilidad intrapoblacional en Córcega del 99,8 % al 100 % para el gen *cox1* y de un 100 % para el gen *cytb*. En los individuos de Sevilla estos valores fueron de un 99,8 % al 100 % para el gen *cox1* y de un 98,1 %-100 % para el gen *cytb*. Respecto a la similitud observada entre ambos orígenes geográficos, se obtuvieron valores del 97,7 % al 98,1 % para el gen *cox1* y del 98,1 % al 98,9 % para el gen *cytb*. Por último, basándonos en los valores medios de divergencia nucleotídica obtenidos y aplicando la regla del 10X de Hebert, concluimos que los linajes genéticos de Sevilla y Córcega no constituían diferentes especies, ya que la divergencia nucleotídica media entre ambas poblaciones nunca superó el umbral de 0,9 % establecido mediante el modelo de distancias K2P (Parámetro Kimura 2).

El estudio filogenético de la especie *A. erinacei* fue realizado en base a cinco marcadores moleculares: tres ribosómicos (18S, ITS1 e ITS2) y dos mitocondriales (*cox1* y *cytb*). El gen 18S solo fue capaz de establecer relaciones filogenéticas a nivel

de familia, así, todos los individuos pertenecientes a la familia Pulicidae, incluyendo *A. erinacei*, aparecían formando un clado monofilético bien soportado y filogenéticamente distante del resto de familias utilizadas para el análisis. Sin embargo, este marcador no estableció diferencias a nivel de especies u origen geográfico. El análisis filogenético basado en los marcadores ITS volvió a agrupar a la familia Pulicidae en un clado monofilético bien soportado y separado del resto de familias. Dentro de este grupo se agruparon todos los individuos correspondientes a la especie *A. erinacei* en un subclado con altos valores de soporte de rama. Dentro de dicho subclado quedaron separados los individuos aislados de Sevilla de aquéllos aislados de Córcega, estableciéndose dos linajes genéticos claramente diferenciados. Dentro de cada uno de estos linajes quedaron agrupadas las hembras de *A. erinacei* en función de su origen geográfico independientemente del OTU al cual pertenecieran (Zurita y col., 2018b). Respecto a los marcadores mitocondriales (*cox1* y *cytb*) y al análisis de las secuencias concatenadas, los árboles filogenéticos obtenidos estuvieron en concordancia con los resultados observados para el ITS1 e ITS2, observándose de nuevo la existencia de dos linajes genéticos dentro de la especie *A. erinacei* (Sevilla y Córcega). Además se observó una relación filogenética más cercana entre los géneros *Archaeopsylla* y *Ctenocephalides* dentro de la familia Pulicidae.

III.1.5. *Pulex irritans*

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio taxonómico basado en datos morfológicos biométricos y moleculares de la especie *P. irritans* también conocida como pulga del hombre, aislada de diferentes hospedadores y de dos zonas geográficas diferentes (España y Argentina) (Figura 16).

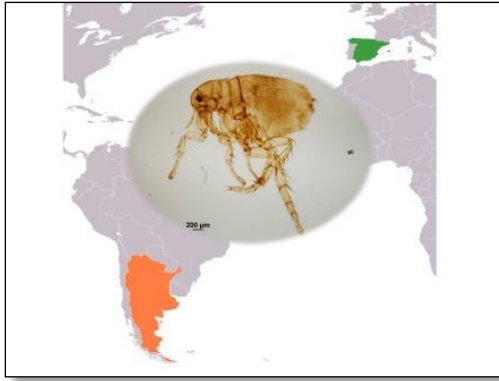


Figura 16: Esquema de las zonas geográficas muestreadas para la especie *P. irritans*.

La clasificación morfológica se basó en la presencia de los siguientes caracteres morfológicos:

- Margen anterior de la cabeza ligeramente redondeada sin la presencia de tubérculos.
- Ctenidio genal vestigial que puede estar o no presente. Ausencia de peine pronotal.
- Club de la antena asimétrico.
- Clava antenal asimétrica.
- Presencia de tres espinas fuertes en la cabeza: genal, pre-ocular y post-antenal.
- Existencia de una hilera de pequeñas espinas en la coxa del tercer par de patas. Esta hilera está compuesta por unas ocho o doce espinas en las hembras y entre siete y diez espinas en los machos.
- Presencia de dos o tres setas en ambos lados del esternito VII de las hembras. Además, se observó una bulga subglobular bastante más pequeña que la hilla.
- Los machos presentaron un clasper muy característico con un telómero bastante largo que cubría por completo al basímero. Además, el aedeagus se caracterizó por presentar una estructura fina y alargada en forma de coma en su zona apical.

Basándonos en los resultados morfológicos obtenidos no se observaron diferencias significativas entre los especímenes de ambas zonas geográficas. Además

los resultados biométricos llevados a cabo sobre un total de 15 parámetros diferentes, tampoco mostraron ningún carácter morfológico capaz de diferenciar entre los individuos de España y Argentina.

Para la caracterización molecular de *P. irritans*, se amplificaron y secuenciaron 4 marcadores moleculares (ITS1, ITS2, *cox1* y *cytb*). La longitud del ITS1 de los individuos de España osciló entre 876 pb y 962 pb en otros, mientras que todos los especímenes aislados de Argentina mostraron una longitud para el ITS1 de 796 pb. Esta diferencia de longitud para el ITS1 se mantuvo en todos los clones estudiados en individuos pertenecientes a los tres grupos (796 pb, 876 pb y 962 pb), oscilando la variabilidad intraindividual observada entre un 99,2 % y un 100 % en individuos de ambas zonas geográficas. Las secuencias de ITS1 revelaron la existencia de una unidad repetitiva compuesta por 86 pb. Se observó que dicha unidad se encontraba por triplicado y duplicado en las secuencias del ITS1 que mostraban una longitud total de 962 pb y 876 pb respectivamente, mientras que en los individuos de Argentina (ITS1 = 796 pb) esta unidad solo aparecía una vez en toda la secuencia. Por otra parte, también se observaron diferencias en la longitud de las secuencias correspondientes al ITS2 dependiendo de la zona geográfica de origen de los individuos estudiados (España: 322 pb y Argentina: 324 pb). Respecto a la similitud intrapoblacional observada en ambos marcadores, ésta siempre osciló entre el 99,5 % y el 100 % en España y un 100 % en Argentina. Sin embargo, los valores de similitud observados entre ambas zonas geográficas fueron más bajos, oscilando entre un 95,9 % y un 96,3 % para el ITS1 y entre un 98,2 % y un 98,5 % para el ITS2.

El estudio de los genes parciales mitocondriales *cox1* (658 pb) y *cytb* (374 pb) no mostró la existencia de ningún tipo de unidad repetitiva en las secuencias obtenidas, sin embargo, en base al gen *cox1* se observaron tres haplotipos en Argentina (H1, H2,

H3) y otros tres más en Sevilla (H4, H5, H6). En base a este mismo gen, se observó una similitud interpoblacional bastante baja que osciló entre el 91,5 % y el 92,0 %. El mapa de restricción obtenido para el gen *cox1* indicó que los especímenes de España y Argentina podían ser fácilmente distinguidos mediante PCR-RFLP. Así, se identificaron varias enzimas de restricción (*AfaI*, *AflIII*, *BfrI* y *HpaII*) que presentaban un sitio de corte en las secuencias *cox1* de los tres haplotipos obtenidos en Argentina y ninguno en las secuencias *cox1* de los tres haplotipos de España. El caso contrario se dio para las enzimas *BglII*, *DraI* y *HincII* que presentaron únicamente sitios de corte para los individuos aislados de España. Por otro lado, el estudio de las secuencias correspondientes al gen *cytb* de ambas zonas geográficas, reveló la existencia de hasta siete haplotipos en Argentina (H1-H7) y otros dos en España (H8-H9), además de una similitud entre ambas regiones que osciló entre un 90,9 % y un 92,2 %.

Para el análisis filogenético de la especie *P. irritans* se analizó un marcador ribosómico (ITS2) y dos marcadores mitocondriales (*cox1* y *cytb*). El árbol filogenético basado en el marcador ITS2 mostró la existencia de un clado bien soportado correspondiente a la familia Pulicidae. Dentro del mismo, se observó un subclado que englobaba a todos los individuos pertenecientes a la especie *P. irritans*, que a su vez quedaban separados en función de su origen geográfico (España o Argentina). La existencia de estos dos linajes genéticos dentro de la especie *P. irritans* estuvo presente en el árbol obtenido para el resto de marcadores analizados, incluyendo el análisis concatenado de las secuencias. Además, el árbol filogenético basado en el gen *cox1* mostró al género *Pulex* estrechamente relacionado con *Echidnophaga* sp. dentro de la familia Pulicidae.

III.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN DISTINTAS ESPECIES DE SIFONÁPTEROS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES (Zurita y col., 2016b)

En la presente Tesis Doctoral se evaluó la presencia de hasta cinco géneros distintos de bacterias patógenas (*Rickettsia* sp., *Bartonella* sp., *Borrelia* sp., *Wolbachia* sp. y *Mycobacterium* sp.) así como la presencia de cinco especies de bacterias patógenas (*R. felis*, *R. typhi*, *B. henselae*, *B. quintana* y *C. burnetti*). Para ello, se utilizaron técnicas de detección molecular (qPCR y PCR estándar) utilizando cebadores específicos para cada género o especie patógena estudiada (Anexo I, tabla 8). Las especies de sifonápteros objeto de estudio fueron *C. felis*, *N. fasciatus*, *S. tripectinata* y *P. irritans*.

Wolbachia sp. fue el simbionte que presentó un mayor porcentaje de prevalencia, aunque se detectó solo en las especies *C. felis* y *P. irritans*. Así, el porcentaje de prevalencia en *C. felis* osciló siempre entre un 60 % y un 70 % en distintas regiones de Andalucía (sur de España) y Sudáfrica, exceptuando Dílar en Granada (40 %) y Nashtarood en Irán (30 %). Por otro lado, la prevalencia de este simbionte en *P. irritans* de Sevilla fue del 96 %. Los estudios filogenéticos basados en las secuencias obtenidas tras la amplificación del gen 16S del ADNr de *Wolbachia* sp. agruparon en el mismo clado nuestras secuencias obtenidas con aquéllas pertenecientes a la especie *Wolbachia pipientis*.

Con respecto al género *Bartonella*, éste fue detectado en la subespecie *S. t. tripectinata* aislada de distintos hospedadores roedores procedentes de las Islas Canarias (España) y la Isla de Córcega (Francia), también en *P. irritans* de Sevilla y en *N. fasciatus* aislados de hospedadores roedores de la Isla de Córcega; sin embargo, el

porcentaje de prevalencia y las especies de *Bartonella* detectadas variaron en función de la especie sifonáptera estudiada y su origen geográfico. Así por ejemplo, los estudios filogenéticos y moleculares llevados a cabo sobre las secuencias de la región ITS de *Bartonella* sp. obtenidas de *S. t. tripectinata* de las islas de El Hierro, La Palma y Tenerife (Islas Canarias) identificaron nuestras secuencias como *Bartonella elizabethae* con una prevalencia del 43,8 %. Por su parte, hasta tres especies distintas de este género (*B. elizabethae*, *B. henselae* y *B. quintana*) fueron detectadas en la misma especie sifonáptera pero en individuos procedentes de Córcega, con una prevalencia del 14 %, 9 % y 14 %, respectivamente. En *N. fasciatus* de Córcega se detectó *B. henselae* y *B. elizabethae* con una prevalencia del 13 % y 4 %, respectivamente, además de hasta un 13 % de individuos positivos para *Bartonella* sp. Sin embargo para éstos últimos, no fue posible realizar una detección del patógeno a nivel de especie mediante técnicas moleculares. Por último, los resultados de prevalencia de este género en *P. irritans* de Sevilla estuvo en concordancia con los del resto de especies estudiadas observándose una prevalencia del 9 %.

Para el género *Rickettsia* únicamente se obtuvieron resultados positivos para la especie *C. felis* en individuos procedentes de Sevilla y Cádiz (sur de España). Esta prevalencia fue del 28 % y en todos los casos la especie detectada fue *R. felis*. Un porcentaje mucho menor fue el observado para el género *Mycobacterium* sp., que solo fue detectado en *C. felis* y *P. irritans* de Sevilla con una prevalencia del 2 % y 4 %, respectivamente. Al igual que ocurrió con la detección de *Bartonella* sp. en algunos especímenes de *N. fasciatus*, *Mycobacterium* sp. pudo detectarse mediante la técnica cuantitativa qPCR; sin embargo, no se pudo llevar a cabo una amplificación mediante PCR de ninguna región de ADN con el fin de realizar una identificación a nivel de

especie. Por último, no se observaron resultados positivos en ninguna de las especies de sifonápteros estudiadas para las bacterias *R. typhi*, *C. burnetti* y *Borrelia* sp.

III.3. IDENTIFICACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA Y POSIBLES BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A ELLAS MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA MALDI-TOF MS

Utilizando el protocolo de homogenización y preparación descrito en el anexo Material y Métodos para muestras preservadas en alcohol, conseguimos obtener espectros de referencia de alta calidad (alta reproducibilidad y alta intensidad espectral) para las cuatro especies estudiadas (*C. felis*, *P. irritans*, *S. tripectinata* y *N. fasciatus*). Además, actualizamos la base de datos con 19 nuevos espectros de referencia para las 4 especies anteriormente citadas: *C. felis* (n= 6), *P. irritans* (n= 3) (Figura 17), *S. tripectinata* (n= 5) y *N. fasciatus* (n= 5). Para realizar el test ciego se utilizaron un total de 87 especímenes, que fueron testados utilizando la base de datos actualizada. Mediante este test ciego se identificaron correctamente a nivel de especies el 100 % de las muestras evaluadas, indistintamente de su origen geográfico o estatus infeccioso. Para el test ciego de *C. felis* se utilizaron un total de 32 especímenes, de los cuales 29 (90,6 %) fueron correctamente identificados con altos valores logarítmicos (LSV) que oscilaron entre 1,80 y 2,54, mientras que los otros tres especímenes restantes (9,4 %) fueron correctamente identificados pero con bajos LSVs (1,31-1,66). Para la especie *P. irritans* un total de 20 muestras fueron testadas, identificándose todas ellas correctamente con altos LSVs (1,84-2,35). Resultados similares fueron obtenidos en el test ciego de *S. tripectinata* (17 muestras) y *N. fasciatus* (18 muestras), donde todos los especímenes testados fueron correctamente identificados con altos LSVs, que oscilaron entre 1,87 y 2,28. Todas las muestras identificadas en el test ciego mostraron

concordancia con los resultados morfológicos y moleculares obtenidos. Cabe destacar que las especies *C. felis* y *S. tripectinata* ya poseían espectros de referencia depositados en la base de datos; sin embargo, estos espectros provenían de muestras frescas, presentando diferencias significativas en el perfil espectral en comparación con los espectros obtenidos para muestras conservadas en alcohol. De este modo, en ausencia de estos últimos, la identificación no siempre fue correcta, o a veces lo era pero con bajos valores logarítmicos de fiabilidad.

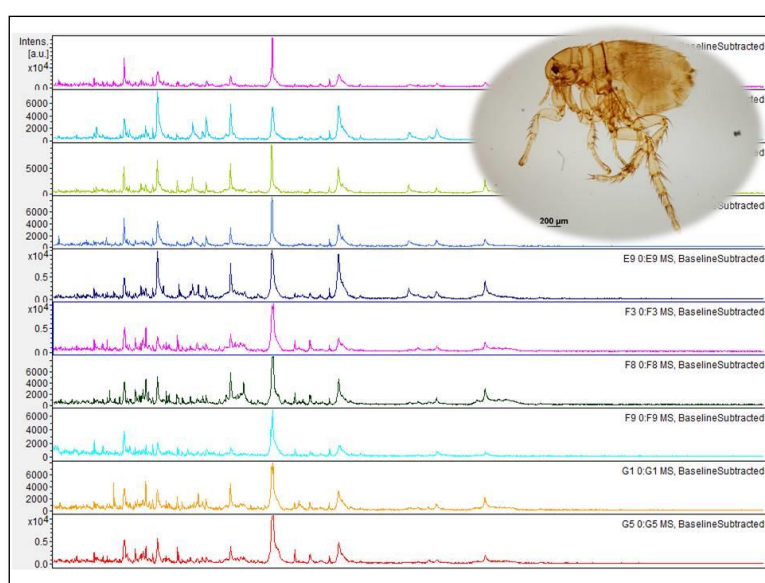


Figura 17: Espectros obtenidos para la especie *P. irritans* mediante el uso de la técnica MALDI-TOF MS.

Para evaluar la presencia de picos espectrales discriminativos en función del estatus infeccioso de cada muestra, establecimos para cada especie un grupo control compuesto por al menos diez especímenes no infectados con las bacterias patógenas estudiadas mediante técnicas moleculares. Este grupo control fue comparado con otro grupo compuesto por al menos tres especímenes de la misma especie infectados por la misma bacteria. Desafortunadamente, solo pudimos establecer un grupo control para las especies *N. fasciatus* y *S. tripectinata*, ya que para *P. irritans* y *C. felis* no obtuvimos un número representativo de muestras no infectadas. El Análisis de los Principales Componentes (PCA) para *S. tripectinata* infectada y no infectada por distintas especies

de *Bartonella* no mostró áreas de solapamiento entre ambos grupos en ninguno de los casos estudiados. Estas diferencias espectrales entre ambos grupos fue corroborada con la comparación de los espectros promedio que revelaron la existencia de numerosos picos discriminativos en las muestras de *S. tripectinata* infectadas por *B. elizabethae*, *B. henselae* y *B. quintana*.

Para *N. fasciatus* el PCA mostró una pequeña área de solapamiento entre el grupo control y las muestras infectadas por *B. henselae*; sin embargo, en esta ocasión no se detectaron picos discriminativos entre los espectros promedio de ambos grupos.

Por último en el dendrograma realizado con los espectros de referencia de las cuatro especies estudiadas se pudo observar las cuatro especies claramente separadas, agrupándose aquéllas que pertenecían a la misma familia en un mismo clado (*P. irritans* y *C. felis*).



III.4. PUBLICACIONES

Molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny

A. Zurita¹, R. Callejón¹, M. De Rojas¹, M.S. Gómez López^{2*} and C. Cutillas^{1*}

¹Department of Microbiology and Parasitology. Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain:

²Department of Microbiology and Parasitology. Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda, Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

Abstract

In the present work, we carried out a comparative molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* isolated from *Mus musculus* from the Canary Islands, Spain. The Internal Transcribed Spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2) and 18S ribosomal RNA partial gene and cytochrome c-oxidase 1 (*cox1*) mitochondrial DNA partial gene sequences of this subspecies were determined to clarify the taxonomic status of this subspecies and to assess inter-population variation and inter-specific sequence differences. In addition, we have carried out a comparative phylogenetic study with other species of fleas using Bayesian, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Neighbor-Joining analysis. A geographical signal was detected between the *cox1* partial gene sequences of *S. t. tripectinata* isolated from *M. musculus* from different islands and those isolated from *Apodemus sylvaticus* from the Iberian Peninsula. Our results assess the monophyletic origin of Stenoponiinae and a different genetic lineage from Ctenophthalmidae. Thus, the elevation of subfamily Stenoponiinae to family level (Stenoponiidae) is suggested.

Keywords: *Stenoponia tripectinata tripectinata*, ribosomal RNA, cytochrome c-oxidase 1, Canary Islands, Siphonaptera

(Accepted 7 July 2015; First published online 18 August 2015)

Introduction

Fleas (Insecta, Siphonaptera) form a distinct group of wingless bloodsucking insects with complete metamorphosis. About 2574 species belonging to 16 families and 238 genera were described (Bitam *et al.*, 2010). Lewis (1998) recognized 15 families considering Ctenophthalmidae, while Medvedev (1998) treated Hystrichopsyllidae as a large family that includes

Hystrichopsyllinae and the subfamilies that were traditionally placed within Ctenophthalmidae. This family (*sensu* Lewis, 1993a) consists of nine subfamilies and 17 described tribes, with 42 genera and 664 species. Roughly one quarter of flea species are placed within this group and Ctenophthalmidae has been traditionally the 'catchall' family for fleas that have been difficult to assign to other families (Whiting *et al.*, 2008). These authors reconstructed deep level evolutionary relationships for fleas (Insecta: Siphonaptera) based on 28S, 18S, COII and elongation factor 1-alpha (EF1- α) sequences and found, in their analysis, that this family was paraphyletic. The current arrangement of Ctenophthalmidae is clearly in a state of disarray; however, if one assesses the phylogeny based on the subfamily, five natural groupings may be observed:

*Author for correspondence
 Phone: +34 95 4556773
 Fax: +34 95 4628162
 E-mail: cutillas@us.es

Ctenophthalminae, Doratopsyllinae, Neopsyllinae, Stenoponiinae and the Rhadinopsyllinae (Whiting *et al.*, 2008). These authors concluded that the catchall group Ctenophthalmidae is clearly an unnatural grouping of fleas, and elevating each of its constituent subfamilies to family level would be a closer reflection of their phylogeny. Furthermore, Ctenophthalmidae has been generally associated with insectivorous hosts (Soricidae) as the main hosts, but members of this family have been reported parasitizing rodents (Muridae) (Acosta, 2005).

The Holarctic subfamily Stenoponiinae are all very large and darkly pigmented fleas with a striking genal comb spanning most of the lateral portion of the head. Species from the Nearctic (*Stenoponia americana*), Palearctic (*Stenoponia tripectinata medialis*), and the Oriental (*Stenoponia sidimi*) regions parasitize murid rodents.

The genus *Stenoponia* (Ctenophthalmidae) Hopkins & Rothschild, 1962, is a Holarctic genus of 16 species and 14 subspecies which includes *Stenoponia tripectinata tripectinata*, the vector of plague in Asia Minor and European Russia (Lewis, 1993b). To date, *S. tripectinata* has been documented in Turkey, Greece, Romania, Italy, France and the Iberian Peninsula (Sánchez & Gómez, 2012). Furthermore, Sánchez & Gómez (2012) reported, for the first time the geographical and host distribution of *S. t. tripectinata* parasitizing *Mus musculus* on the Canary Islands, Spain.

The specific differentiation of fleas has been carried out according to morphological characteristics based on the shape and structure of their complex genitalia and the presence and the distribution of setae, spines and ctenidia on the body (Dunnet & Mardon, 1999; Whiting, 2002). Nevertheless, the phenotype is conditioned by different factors: host, ambient conditions, feeding, etc., and many species and subspecies of fleas were reported based on a new host or on the presence or absence of putative 'specific' morphological and biometrical characters. All these difficulties and this incertitude, in discriminating among flea species, claims for the need of adding molecular data to the observation of morphological characters to study the taxonomy of the group.

Among the different molecular markers used in systematics, the Internal Transcribed Spacer regions 1 and 2 (ITS1 and ITS2) ribosomal DNA (rDNA) remains a valuable marker, in particular arthropods to discriminate between species (Marrugal *et al.*, 2013; Monje *et al.*, 2013) or also within species (Essig *et al.*, 1999; Marcilla *et al.*, 2002) and it has been revealed to be informative to establish phylogenetic relationships at the genus level (Zagoskin *et al.*, 2014). Vobis *et al.* (2004) carried out a molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* based on the analysis of the ITS1 and ITS2. These regions have also been used to differentiate populations within mite species (De Rojas *et al.*, 2007).

Furthermore, mitochondrial DNA (mtDNA) has remained as evaluable marker for population, biogeographic and phylogenetic studies. It is also used for taxonomic purposes, where determinate fragments are used as mtDNA sequence tags or bar-code for species diagnostics (Hebert *et al.*, 2003). It remains, however, that while mtDNA sequences are very useful markers, their use is not without complication. Ballard & Whitlock (2004) argued that mtDNA evolution is non-neutral with sufficient regularity to question its utility as a marker for genomic history. Direct selection (selection on mtDNA itself) and indirect selection (selection arising from disequilibrium with other maternally transmitted genes) is sufficiently common to impose caution when making phylogenetic inferences

based on mtDNA data alone. Thus, Hurst & Jiggins (2005) concluded that mtDNA is inappropriate as a sole marker in studies of the recent history of arthropods and, potentially, other invertebrates.

In the present work, we carried out a comparative molecular study of *S. t. tripectinata* isolated from *M. musculus* from different islands from the Canary Islands, Spain. To this end, the ITS1, ITS2 and 18S of the rDNA and a fragment of the cytochrome c-oxidase 1 (*cox1*) gene of the mitochondrial DNA of this subspecies were sequenced in order to clarify the taxonomic status of this subspecies and to assess inter-population variation and inter-specific sequence differences. Based on the sequences produced here, together with data of additional flea species retrieved from public databases, we also carried out a comparative phylogeographic analysis Bayesian, Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) inference.

Material and Methods

Collection of samples

Rodents were captured using live traps on all the islands. Fleas were collected from mice (*M. musculus*) from different islands of the Canary Islands (Gran Canaria, La Palma, El Hierro, La Gomera and Tenerife) (Spain) (table 1). Fleas were collected manually and kept in an Eppendorf tube with 70% ethanol until required for subsequent identification and sequencing. Specific identification was based on morphological characteristics (Jordan 1958; Hopkins & Rothschild, 1962; Beaucourmu & Launay, 1990). For details concerning host distribution on each island of the Canarian Archipelago and distribution of *S. t. tripectinata* in different biotopes (Laurisilva, Pine forest, etc) see Sánchez & Gómez (2012).

Molecular study

Single fleas were frozen in liquid nitrogen and pulverized in a mortar. Genomic DNA was isolated using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The ITS1 region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a thermocycler (Perkin Elmer) and the PCR mix and PCR conditions were applied as previously described by Marrugal *et al.* (2013). Primers were NC5 (Gasser *et al.*, 1996) and ITS1rev (Marrugal *et al.*, 2013). For the ITS2 region the PCR mix used was the same as for the ITS1 region and the conditions were: 94°C at 5 min (denaturing), 35 cycles at 94°C at 60 s (denaturing), 55°C at 60 s (annealing), 72°C at 60 s (primer extension), followed by 10 min at 72°C. Forward and reverse primers for ITS2 region were *senITS2* (Vobis *et al.*, 2004) and *ITS2R*, respectively (Vobis *et al.*, 2004). In the case of 18S partial gene region, the PCR mix was: 5 µl 10× PCR buffer, 1 µl 10 Mm dNTP mixture (0.2 mM each), 2 µl 50 mM MgCl₂, 5 µl primer mix (1 mM each), 5 µl template DNA, 0.5 µl *Taq* DNA polymerase (2.5 units) and autoclaved distilled water to 50 µl. The PCR conditions and primers (18SF and 18SR) were defined by Kaewmongkol *et al.* (2011). *Cox1* mtDNA partial gene was amplified using PCR conditions designed for amplification of *cox1* from fleas' isolates by Kaewmongkol *et al.* (2011). The cycling conditions consisted of a pre-PCR step of 96°C for 2 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s and an extension of 72°C for 60 s with a final extension of 72°C for 7 min. Forward and reverse primers for the

Table 1. GenBank accession numbers of ITS1, ITS2, *cox1* partial gene and 18S partial gene sequences of individuals of *Stenoponia tripectinata* isolated of *Mus musculus* from the Canary Islands (Spain).

Island	Number of base pairs (bp)	G + C%	Accession number
<i>ITS1 S. t. tripectinata</i>			
Gran Canaria	1205	52.4	LK937051
Gran Canaria	1205	52.5	LK937052
Gran Canaria	1205	52.6	LK937053
Gran Canaria (Clone 1)	1205	52.5	LN847260
Gran Canaria (Clone 2)	1205	52.5	
Gran Canaria (Clone 3)	1205	52.6	LN847261
Gran Canaria (Clone 4)	1205	52.3	LN847262
La Palma	1204	52.4	LK937054
La Palma	1205	52.7	LK937055
La Palma	1205	52.5	LK937056
El Hierro	1207	52.3	LK937057
El Hierro	1209	52.5	LK937058
El Hierro	1205	52.5	LK937059
La Gomera	1205	52.5	LK937060
La Gomera	1205	52.6	LK937061
La Gomera	1205	52.6	LK937062
Tenerife	1205	52.5	LK937063
Tenerife	1205	52.5	LK937064
Tenerife	1207	52.5	LK937065
<i>ITS2 S. t. tripectinata</i>			
Gran Canaria	332	48.2	LK937035
Gran Canaria	332	48.2	LK937036
Gran Canaria	332	48.2	LK937037
Gran Canaria	332	48.2	LK937038
Gran Canaria (Clone 1)	332	48.2	LN847258
Gran Canaria (Clone 2)	332	48.2	
Gran Canaria (Clone 3)	332	48.2	
Gran Canaria (Clone 4)	332	48.2	
Gran Canaria (Clone 5)	332	48.2	
Gran Canaria (Clone 6)	332	48.2	
Gran Canaria (Clone 7)	332	47.9	LN847259
La Palma	332	48.2	LK937039
La Palma	332	47.9	LK937040
La Palma	332	48.2	LK937041
El Hierro	332	48.2	LK937042
El Hierro	332	48.2	LK937043
El Hierro	332	48.3	LK937044
La Gomera	332	48.2	LK937045
La Gomera	332	48.2	LK937046
La Gomera	332	48.2	LK937047
Tenerife	332	48.2	LK937048
Tenerife	332	48.2	LK937049
Tenerife	332	48.2	LK937050
<i>cox1 S. t. tripectinata</i>			
Gran Canaria	677	28.8	LK937071
Gran Canaria	677	28.6	LK937072
La Palma	677	29	LK937073
La Palma	677	28.8	LK937074
El Hierro	677	28.8	LK937075
El Hierro	677	28.8	LK937076
El Hierro	677	28.8	LK937077
La Gomera	677	28.6	LK937078
La Gomera	677	28.9	LK937079
La Gomera	677	28.8	LK937080
Tenerife	677	28.8	LK937081
Tenerife	677	28.8	LK937082
Tenerife	677	28.8	LK937083
<i>18S S. t. tripectinata</i>			
Gran Canaria	1095	50.4	LK937066
La Palma	1098	50.5	LK937068
El Hierro	1096	50.5	LK937067
La Gomera	1096	50.5	LK937069
Tenerife	1096	50.5	LK937070

cox1 were: LCO1490 and HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), respectively.

The rDNA intra-individual variation was determined by sequencing four to seven clones of one individual per geographical population of *S. t. tripectinata*. The PCR products were eluted from the agarose by using the WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and transformation was carried out as cited by Cutillas *et al.* (2009). Plasmids were purified using a Wizard Plus SV (Promega) and sequenced by Stab Vida (Portugal) with a universal primer (M13).

All the phylogenetic analyses were performed on the rDNA and mtDNA datasets, and sequences were aligned using the Clustal W program version 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). The intra-population variation was determined for the rDNA and mtDNA by sequencing three individuals from each island. Furthermore, all the sequences were aligned and compared with each other using the CLUSTAL W program. Alignments were manually adjusted.

Phylogenetic relationships were analyzed using four different methods: NJ and MP trees were generated from methods using the MEGA 5 program from Tamura *et al.* (2011), ML using the phylogenetic estimation using maximum likelihood (PHYML) package from Guindon & Gascuel (2003) and Bayesian inferences (BI) were performed from Mr. Bayes-3.1.2. For the Bayesian analysis, we ran three independent runs of four Markov chains for 10 million generations, sampling every 500 generations. The Bayesian posterior probabilities are percentage converted. For ML inference, the JMODELTEST (Posada, 2008) program was also used to determine the best fit substitution model for the parasite data (18S, ITS1, ITS2 and *cox1*). Models of evolution were chosen for subsequent analysis according to the Akaike Information Criterion (Huelsenbeck and Rannala, 1997; Posada and Buckley, 2004). Best-fit nucleotide substitution models included general time-reversible (GTR) model with gamma-distributed rate variation and a proportion of invariable sites, GTR + I + G (18S), Hasegawa-Kishino-Yano, HKY85 + I + G (ITS1), GT + G (ITS2) and GTR + G (*cox1*). Support for the topology was examined using bootstrapping (heuristic option) (Felsenstein, 1985) over 1000 replications.

The phylogenetic and phylogeographic analysis, based on ITS1, ITS2, 18S and *cox1* sequences was carried out using sequences obtained from GenBank (Appendix 1). Phylogenetic trees based on 18S rRNA and *cox1* mtDNA were rooted including two outgroup species representing members of the Order Mecoptera: *Microchorista philpotti* and *Boreus elegans* (*cox1*) and *Nannochorista dipteroides* and *Boreus coloradensis* (18S) (Appendix 1), whereas phylogenetic trees based on ITS1 and ITS2 sequences were constructed using different outgroup species representing members of Order Diptera (*Anopheles farauti*, *Anopheles lesteri*, *Anopheles anthropophagus*, *Muscina stabulans* and *Philornis seguyi*). No ITS sequences of Order Mecoptera were found in public database.

Results

No morphological differences were observed between individuals of *S. t. tripectinata* isolated from *Mus musculus* from different islands. ITS1 sequences of the ribosomal DNA (rDNA) of different populations of *S. t. tripectinata* were 1204–1209 base pairs (bp) in length (table 1), while the ITS2 sequences of *S. t. tripectinata* were 332 bp in length (table 1). Furthermore, the *cox1* and 18S partial gene sequences of *S. t. tripectinata* were 677 bp and 1095–1098 bp in length,

Table 2. Intra-individual, intra-population (*) and inter-population similarity observed in ITS1 sequences in *Stenoponia tripectinata tripectinata* populations isolated from different islands from the Canary Islands (Spain).

ITS1	GRAN CANARIA (%)	EL HIERRO (%)	LA GOMERA (%)	LA PALMA (%)	TENERIFE (%)
GRAN CANARIA	Intra-individual 99.6–100 Intra-population (*) 99.2–99.8				
EL HIERRO	99–100	99.2–99.8*			
LA GOMERA	98.9–99.9	99–99.9	99.2–99.8*		
LA PALMA	99.9–100	99.2–99.8	99–99.8	99.2–99.6*	
TENERIFE	99.6–100	99.4–100	99.3–99.9	99.4–99.6	100*

Table 3. Intra-individual, intra-population (*) and inter-population similarity observed in ITS2 sequences in *Stenoponia tripectinata tripectinata* populations isolated from different islands from the Canary Islands (Spain).

ITS2	GRAN CANARIA (%)	EL HIERRO (%)	LA GOMERA (%)	LA PALMA (%)	TENERIFE (%)
GRAN CANARIA	Intra-individual 99.7–100 Intra-population (*) 100				
EL HIERRO	100	100 (*)			
LA GOMERA	100	100	100 (*)		
LA PALMA	99.7–100	99.7–100	99.7–100	99.4–99.7 (*)	
TENERIFE	100	100	100	99.7–100	100 (*)

respectively (table 1). All the sequences (ITS1, ITS2, 18S and *cox1* partial gene) of *S. t. tripectinata* isolated from *M. musculus* from different islands were deposited in GenBank database (table 1).

ITS1 and ITS2

The intra-individual, intra-population and inter-population similarities of *S. t. tripectinata* isolated from *M. musculus* are shown in table 2 (ITS1) and table 3 (ITS2). No ITS1 sequences of others species of family Ctenophthalmidae were found in GenBank. Thus, no molecular comparative analysis between them could be performed.

The phylogenetic analysis based on ITS1 and ITS2 sequences showed a substantial length variation in the alignment which compromised inferences of positional homology. Furthermore, *Anopheles* spp. seemed to be a poor outgroup due to long-branch problems affecting root-placement.

18S rRNA partial gene

The intra-population and inter-population similarities were of 100%. Furthermore, the inter-specific similarity was of 99.6% (*S. t. tripectinata*-*S. t. medialis*), 99.8% (*S. t. tripectinata*-*S. americana*) and 99.9% (*S. t. tripectinata*-*S. sidimi*). The Bayesian, MP, NJ and ML analysis reconstructed a similar topology. The phylogenetic tree (fig. 1) constructed for the 18S rRNA partial gene sequences of *S. t. tripectinata* with those sequences from GenBank of species belonging to the family Ctenophthalmidae, Leptopsyllidae and Ceratophyllidae revealed the individuals of *S. t. tripectinata* clustering together with *S. t. medialis*, *S. americana* and *S. sidimi* (fig. 1). Subfamily Stenoponiinae appeared related with family Ceratophyllidae and Leptopsyllidae and separated, in polytomy, from Ctenophthalmidae (fig. 1).

Cox1 mtDNA partial gene

The intra-population and inter-population similarities are shown in table 4. When sequences of this *cox1* mtDNA partial gene of *S. t. tripectinata* isolated from different islands were

compared with those obtained in GenBank from the Iberian Peninsula (see Appendix 1) we noticed that both populations displayed slight differences (98.9–99.7%) (table 4). Based on the *cox1* mtDNA partial gene sequences, a restriction map was constructed. Three endonucleases located at position 200 (*MseI*, *AseI* and *VspI*) differentiated, clearly, both geographical regions (the Canary Islands and the Iberian Peninsula) (fig. 3).

The phylogenetic tree topology of *S. t. tripectinata* from different geographical origins showed all the individuals from the Canary Islands clustered together, and separated from those individuals from the Iberian Peninsula (fig. 2). Furthermore, all the individuals of *S. t. tripectinata* appeared as a compact group and separated, in polytomy, with the remaining species belonging to different families of Siphonaptera: Ctenophthalmidae, Pygiopsyllidae and Pulicidae (fig. 2).

Discussion

Fleas are holometabolous insects with an uncertain taxonomic classification. This is due to the extreme morphological specialization and the use of the quetotaxy, and the complex genitalia as the main differential diagnostic criteria. Nevertheless, phenotypic characters are influenced by different external factors and there might be synonymies among the described Siphonaptera species reflecting an accepted species being found in a different host and determined as a new species when host species and external factors influence results in a flea with different morphological characteristics. Thus, Marrugal *et al.* (2013) found in *C. felis*, collected from dogs from different geographical locations, four populations with different morphological characteristics which did not correspond with molecular differences. These authors concluded that ITS1 region is a useful tool to approach different taxonomic and phylogenetic questions in *Ctenocephalides* species and they found clear molecular differences between *C. felis* and *C. canis*. In addition, they detected some specific recognition sites for endonucleases in order to differentiate both species.

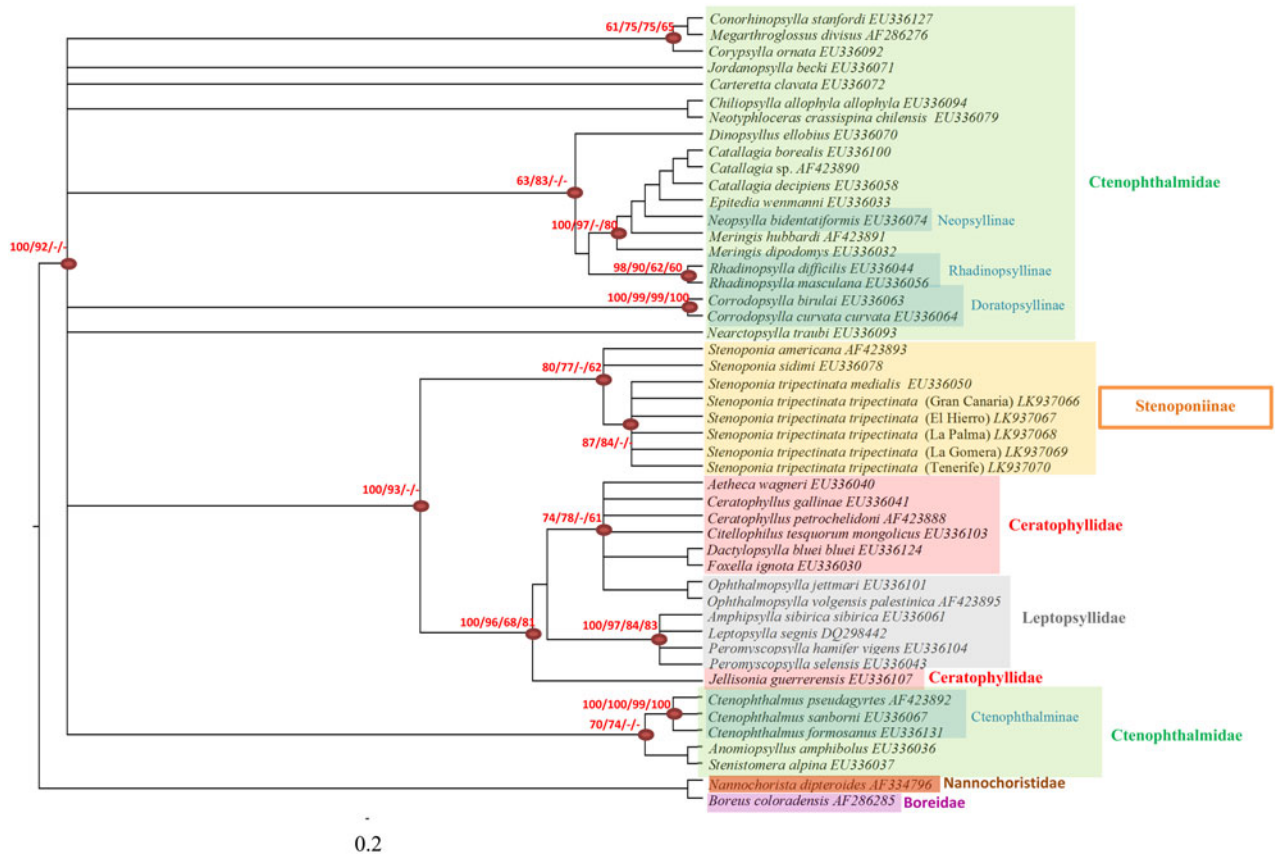


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Stenoponia tripectinata tripectinata* from different geographical origins (see Table 1) based on 18S partial gene of ribosomal RNA inferred using the Bayesian (B), Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) and Neighbor-Joining (NJ) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1.000 replicates) is shown onto the branches (B/ML/MP/NJ). Bootstrap values lower than 60% are not shown. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) are percentage converted.

Table 4. Intra-population (*) and inter-population similarity observed in *cox1* mtDNA partial gene sequences in *Stenoponia tripectinata tripectinata* populations isolated from different islands from the Canary Islands (Spain) and the Iberian Peninsula.

	GRAN CANARIA (%)	EL HIERRO (%)	LA GOMERA (%)	LA PALMA (%)	TENERIFE (%)	<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479241 (%)	<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479242 (%)	<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479243 (%)	<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479244 (%)
GRAN CANARIA	99.7 (*)								
EL HIERRO	99.7–100	100 (*)							
LA GOMERA	99.6–100	99.9–100	99.7–99.9 (*)						
LA PALMA	99.6–100	99.9–100	99.7–100	99.9 (*)					
TENERIFE	99.7–100	100	99.9–100	99.9–100	100 (*)				
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479241	99.1–99.4	99.4	99.2–99.4	99.2–99.4	99.4	–			
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479242	99.4–99.7	99.4	99.2–99.4	99.6–99.7	99.7	99.7	–		
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479243	99.2–99.6	99.6	99.4–99.6	99.4–99.6	99.6	99.2	99.6	–	
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i> KF479244	98.9–99.2	99.2	99.1–99.2	99.1–99.2	99.2	99.2	99.2	99.7	–

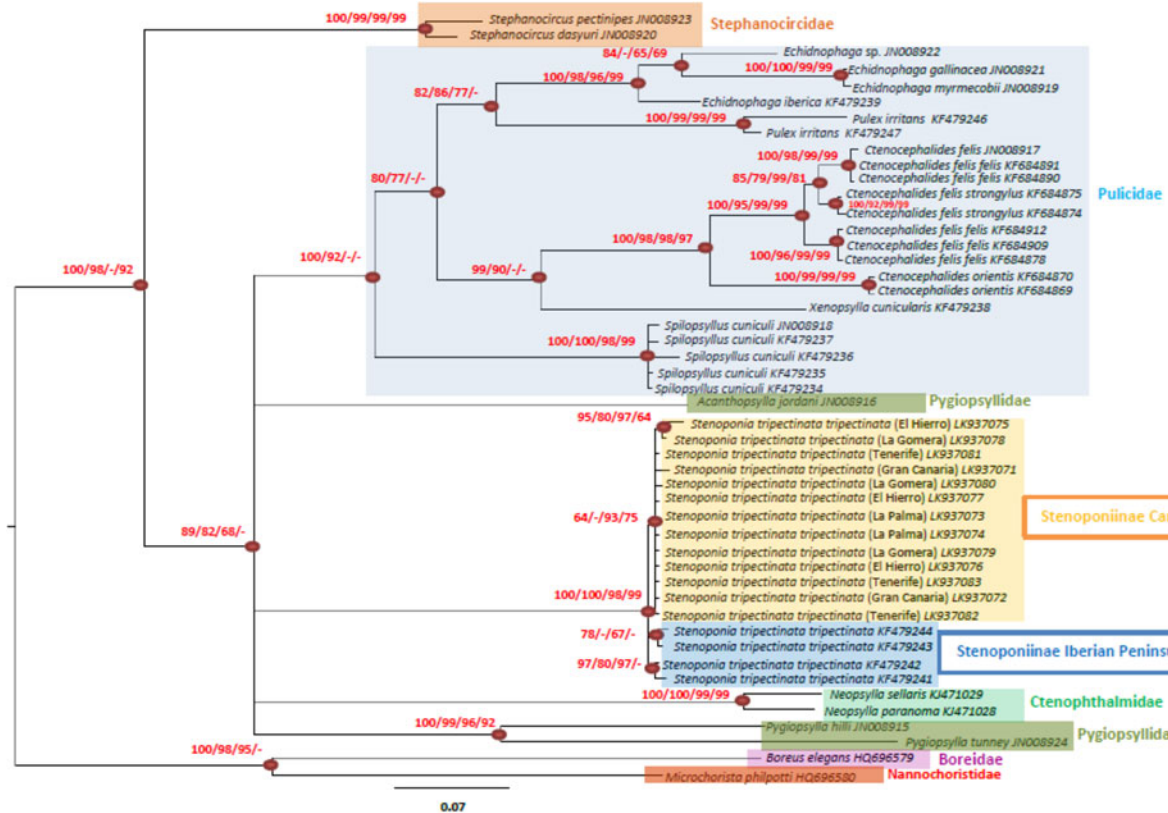


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Stenoponia tripectinata tripectinata* from different geographical origins (see Table 1) based on cytochrome c-oxidase 1 (*cox1*) partial gene of mitochondrial DNA inferred using the Bayesian (B), Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) and Neighbor-Joining (NJ) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown onto the branches (B/ML/MP/NJ). Bootstrap values lower than 60% are not shown. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) are percentage converted.

Stenoponia tripectinata tripectinata (the Canarian archipelago)

AseI **at|taat** 209
 MseI **t|taa** 209
 VspI **at|taat** 209

181 ATTTAATTGGAGGATTGGAAATTG**ATTAAT**TCCTTAATACTTGGAGCTCTGATATA
 181 190 200 210 220 230
 181 TAAATAAACCTCCTAAACCTTAACT**TAATTA**AGGAAATTATGAACCTCGAGGACTATA

S. t. tripectinata (the Iberian Peninsula)

181 ATTTAATTGGAGGATTGGAAATTG**ATTAGT**TCCTTAATACTTGGAGCTCTGATATA
 181 190 200 210 220 230
 181 TAAATAAACCTCCTAAACCTTAACT**TAATCA**AGGAAATTATGAACCTCGAGGACTATA

Fig. 3. Specific restriction endonucleases observed in the *cox1* sequences of *Stenoponia tripectinata tripectinata* from the Canary Archipelago and the Iberian Peninsula.

In the present work, *S. t. tripectinata* isolated from *M. musculus* from different islands from the Canary Islands was studied by amplification and sequencing of ribosomal (ITS1 and ITS2, and 18S rRNA partial gene) and mitochondrial (*cox1* partial gene) DNA markers.

The differences in length in the ITS1 sequences of *S. t. tripectinata* were due to the presence or absence of nucleotides not only among different populations from different islands but also among different clones of the same individual (intra-individual variation). Nevertheless, the range of

percentages of variation observed between different populations was higher than those observed intra-individually (tables 1 and 2).

The ITS2 sequences were markedly shorter than ITS1. This difference in the length of ITS1 and ITS2 sequences was also observed in triatomines by Bargues *et al.* (2006). The intra-population and inter-population similarity was nearly 100% and the highest differences were observed between individuals from La Palma (99.4%). At the inter-population level, it is to be noted that in all sequences analysis (ITS1, ITS2, 18S and *cox1* partial gene), *S. t. tripectinata* populations from the Canary Islands appeared without any particular geographical pattern. ITS2 sequences evolve following the so-called concerted evolution (Smith, 1976) through a process known as molecular drive (Dover, 2002). Molecular drive, involving genomic turnover mechanisms and population dynamic processes, make it possible to homogenize and fix a particular repeat variant within each single reproductive unit. This leads to a lower degree of divergence within than between populations and/or species. This phenomenon clearly explains the lack of nucleotide variation within analyzed populations of *S. t. tripectinata* from different islands of the Canary Islands (see tables 2–4). This result seems to be consistent with other studies of Dipteran species that suggested that ITS2 cannot be utilized in differentiation of geographical populations of some blowfly species (Zaidi *et al.*, 2011).

ITS1 and ITS2 sequences of different species of genus *Stenoponia* were not available in GenBank, thus, we could not confirm that the approach employed here is useful to distinguish species within this genus as cited by other authors for the genus *Ctenocephalides* (Vobis *et al.*, 2004; Marrugal *et al.*, 2013).

The phylogenetic analysis was carried out considering different outgroups (Diptera) but we had problems in performing a multiple alignment correctly. Thus, to address this problem and the absence of other ITS sequences that affects *Stenoponia* genus, 18S rRNA partial gene was sequenced and compared.

Whiting *et al.* (2008) based on 28S, 18S, COII and EF1- α markers reported the monophyly of Stenoponiinae and Rhadinopsyllinae and placed both subfamilies as sister groups but with limited support. In our results, the 18S partial gene tree topology showed Rhadinopsyllinae clustered together with all the subfamilies and tribes included in family Ctenophthalmidae while Stenoponiinae clustered with Ceratophyllidae and Leptopsyllidae.

Furthermore, *cox1* mtDNA partial gene sequences clustered all the populations from the Canary Islands and from the Iberian Peninsula with high support. Nevertheless, island populations showed a lower polymorphism than those from the Iberian Peninsula population. Island populations have shown to have lower levels of genetic variation than those populations from mainland (Dietzen *et al.*, 2006). These two geographical lineages (Iberian Peninsula and Canary Islands) could have arisen due to the existence of geographical barriers.

The *cox1* partial gene phylogenetic tree showed subfamily Stenoponiinae clustering all the species of *Stenoponia* from different geographical origins and in polytomy with Pygiopsyllidae, Ctenophthalmidae and Pulicidae.

This seems to suggest a new status for subfamily Stenoponiinae that was not related with family Ctenophthalmidae, and the suggestion of a new family: Stenoponiidae including species of the genus *Stenoponia*. Unfortunately, 18S partial gene and *cox1* partial gene phylogenetic trees did not resolve at higher taxonomic levels. Furthermore, no other ITS1

sequences of *Stenoponia*, and related genera molecular data are available in GenBank for intra-generic comparisons.

In conclusion, ITS1 and ITS2 sequences were used as molecular markers to characterize *S. t. tripectinata*, while 18S rRNA partial gene and *cox1* mtDNA partial gene assess the monophyletic origin of Stenoponiinae and a different genetic lineage from Ctenophthalmidae. Thus, the elevation of subfamily Stenoponiinae to family level (Stenoponiidae) would be considered. Nevertheless, we must be expecting since the molecular studies in Siphonaptera are scarce and the number of sequences of Siphonaptera in GenBank is low. Thus, the lack of knowledge of mitochondrial and ribosomal genomics for this group is a major limitation for phylogenetic studies. Furthermore, *cox1* sequences revealed two different genetic lineages: the Canary Islands and the Iberian Peninsula, both being separated by specific restriction endonucleases.

Supplementary Material

The supplementary material for this article can be found at <http://www.journals.cambridge.org/BER>

Acknowledgements

The present work was supported by a grant of the V Plan Propio de Investigación of the University of Seville, Spain. We wish to thank Mrs. Anne Kendall for the critical reading of the manuscript.

References

- Acosta, R. (2005) Relationship host-parasite in fleas (Insecta: Siphonaptera) and rodents (Mammalia: Rodentia) from Querétaro state, México. *Folia Entomologica Mexicana* **44**, 37–47.
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729–744.
- Bargues, M.D., Klisiowicz, D.R., Panzera, F., Noireau, F., Marcilla, A., Perez, R., Rojas, M.G., O'Connor, J.E., Gonzalez-Candelas, F., Galvão, C., Jurberg, J., Carcavallo, R.U., Dujardin, J.P. & Mas-Coma, S. (2006) Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infection, Genetics and Evolution* **6**, 46–62.
- Beaucournu, J.C. & Launay, H. (1990) *Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin Méditerranéen Occidental*. Faune de France, 76, Paris, Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, p. 548.
- Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M.F. & Raoult, D. (2010) Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases* **14**, 667–676.
- Cutillas, C., Callejón, R., de Rojas, M., Tewes, B., Ubeda, J.M., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2009) *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica* **111**, 299–307.
- De Rojas, M., Ubeda, J.M., Cutillas, C., Mora, D., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2007) Utility of ITS1–5.8S–ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the genus *Rhinonyssus*: the *Rhinonyssus coniventris* complex. *Parasitology Research* **100**, 1041–1046.
- Dietzen, C., Voigt, C., Wink, M., Gahr, M. & Leitner, S. (2006) Phylogeography of island Canary (*Serinus canaria*) populations. *Journal of Ornithology* **147**, 485–494.

- Dover, G.A. (2002) Molecular drive. *Trends Genetics* **18**, 587–589.
- Dunnet, G.M. & Mardon, D.K. (1999) *Siphonaptera, the Insects of Australia: a Textbook for Students and Research Workers*. 2nd edn. Melbourne, CSIRO and Melbourne University Press, pp. 125–140.
- Essig, A., Rinder, H., Gothe, R. & Zahler, M. (1999) Genetic differentiation of mites of the genus *Chorioptes* (Acari: Psoroptidae). *Experimental and Applied Acarology* **23**, 309–18.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c oxidase* subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **3**, 294–299.
- Gasser, R.B., Nansen, P. & Guldberg, P. (1996) Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Molecular and Cellular Probes* **10**, 99–105.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696–704.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications of birds through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* **270**, 313–321.
- Hopkins, G.H.E. & Rothschild, M. (1962) *An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History)*. Vol. 3. Hystrichopsyllidae, London, Trustees of the British Museum (Natural History).
- Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**, 227–232.
- Hurst, G.D.D. & Jiggins, F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B* **272**, 1525–1534.
- Jordan, K. (1958) A contribution to the taxonomy of *Stenoponia* J. & R. (1911), a genus of Palaearctic and Nearctic fleas. *British Museum (Natural History)* **6**, 169–202.
- Kaewmongkol, G., Kaewmongkol, S., McInnes, L.M., Burmej, H., Bennet, M.D., Adams, P.J., Ryan, U., Irwin, P.J. & Fenwick, S.G. (2011) Genetic characterization of flea derived *Bartonella* species from native animals in Australia suggest host-parasite co evolution. *Infection, Genetics and Evolution* **11**, 1868–1872.
- Larkin, M.A., Blackshields, G. & Brown, N.P. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948.
- Lewis, R.E. (1993a) Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Entomological Society of America* **30**, 239–256.
- Lewis, R.E. (1993b) Fleas (Siphonaptera). pp. 529–575 in Lane, R.P. & Crosskey, R.W. (Eds) *Medical Insects and Arachnids*. London, Chapman and Hall.
- Lewis, R.E. (1998) Résumé of the Siphonaptera (Insecta) of the World. *Journal of Medical Entomology* **35**, 377–389.
- Marcilla, A., Bargues, M.D., Abad-Franch, F., Panzera, F., Carcavallo, R.U., Noireau, F., Galvão, C., Jurberg, J., Miles, M.A., Dujardin, J.P. & Mas-Coma, S. (2002) Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution* **1**, 225–35.
- Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research* **112**, 2289–2298.
- Medvedev, S.G. (1998) Classification on fleas (Order Siphonaptera) and its theoretical foundations. *Entomological Review* **78**, 1080–1093.
- Monje, L.D., Quiroga, M., Manzoli, D., Couri, M.S., Silvestri, L., Venzal, J.M., Cuervo, P. & Beldomenico, P.M. (2013) Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from *Philornis seguyi* (García, 1952) and *Philornis torquans* (Nielsen, 1913) (Diptera: Muscidae). *Systematic Parasitology* **86**, 41–53.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253–1256.
- Posada, D. & Buckley, T.R. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* **53**, 793–808.
- Sánchez, S. & Gómez, M.S. (2012) Presence of *Stenoponia tripectinata* (Tiraboschi, 1902) (Siphonaptera, Ctenophthalmidae) in murine (Rodentia) from the Canary Islands. *Acta Parasitologica* **57**, 190–193.
- Smith, G.P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191**, 528–535.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731–2739.
- Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagburn, B. L., Bond, R., Denholm, I., Dryden, M.W., Payne, P., Rust, M. K., Schroeder, L., Vaughn, M.B. & Bledsoe, D. (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research* **94**, 219–226.
- Whiting, M.F. (2002) Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica scripta* **31**, 93–104.
- Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W. & Dittmar, K. (2008) A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics* **24**, 677–707.
- Zagoskin, M.V., Lazareva, V.I., Grishanin, A.K. & Mukha, D.V. (2014) Phylogenetic information content of Copepoda ribosomal DNA repeat units: ITS1 and ITS2 impact. *BioMed Research International* **2014**, 926342. doi:10.1155/2014/926342.
- Zaidi, F., Wei, S.J., Shi, M. & Chen, X.X. (2011) Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. *Journal of Insect Science* **11**, 59.

Ctenocephalides felis and *Ctenocephalides canis*: introgressive hybridization?

ANTONIO ZURITA¹, ROCÍO CALLEJÓN¹, MANUEL DE ROJAS¹,
ALI HALAJIAN² and CRISTINA CUTILLAS¹

¹Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain and ²Department of Biodiversity (Zoology), University of Limpopo, Polokwane, South Africa

Abstract. In the present work, a comparative molecular study of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs (*Canis lupus familiaris*) from different geographical regions (Spain, Iran and South Africa) was carried out. We found morphological variations in *C. felis* that do not correspond with molecular differences. The Internal Transcribed Spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2) and 18S rRNA partial gene, and cytochrome c-oxidase 1 (*cox1*) mtDNA partial gene sequences were determined to clarify the taxonomic status of these two species, and to assess interpopulation variation and interspecific sequence differences. In addition, a comparative phylogenetic study with other species of fleas using Bayesian, Maximum Parsimony and Maximum Likelihood analysis was performed. The 18S rRNA partial gene fragment was useful neither to discriminate *C. canis* and *C. felis* nor to infer phylogenetic relationships at this level, whereas ITS1 and ITS2 assessed for specific determination in the genus *Ctenocephalides*. The *cox1* mtDNA sequences of *C. felis* revealed three main haplotypes and we suggest that there has been introgression of *C. canis cox1* mtDNA into *C. felis* by *Wolbachia pipientis*. Based on *cox1* sequences, restriction mapping identified many endonucleases that could be used to delineate different haplotypes of *C. felis* and to differentiate *C. felis* and *C. canis*.

Introduction

Fleas (Siphonaptera) constitute a highly distinct group of holometabolous bloodsucking insects which currently involve about 2574 species-level taxa belonging to 16 families and 238 genera (Bitam *et al.*, 2010).

Some authors have argued that Siphonaptera is the most completely studied order of insects (Medvedev, 1994), and although this is perhaps true from a morphological-level classification point of view, from a phylogenetic standpoint they have been sorely neglected as a group. Classically, the major obstacle in flea phylogeny has been their extreme morphological specialization associated with ectoparasitism, and the inability of systematics to homogenize characters adequately across flea and outgroup taxa (Whiting *et al.*, 2008). In the past 30 years, there have been over 3000 publications dealing with some aspects of fleas (Lewis & Lewis, 1985), but only a few instances of formal

cladistics analysis (Acosta, 2010; Acosta & Morrone, 2013; Gao *et al.*, 2013), so in-depth and continuous studies based on molecular data are needed to clarify the unknown phylogeny of this order.

The Order Siphonaptera has also been widely studied due to its clinical importance for human health because species of this group may play a role as parasites by causing allergic dermatitis or other conditions as a result of their feeding activities. Furthermore, fleas serve as intermediate hosts for parasitic worms, and transmit important pathogens such as *Rickettsia typhi*, *Yersinia pestis*, *Bartonella henselae* and *Francisella tularensis* (Eisen & Gage, 2012).

Within this order, the genus *Ctenocephalides* Stiles & Collins, 1930 is one of the most studied lineages because they tend to parasitize domestic animals such as dogs, cats or other pets which may play an important role as bridging hosts for fleas of different animals (Dobler & Pfeffer, 2011). Thirteen species and four subspecies are recognized within this genus (Beaucournu & Ménier, 1998; Lawrence *et al.*, 2014) out of which *Ctenocephalides felis* and *C. canis* have been the most studied species by different

Correspondence: Dr. Cristina Cutillas, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Prof. García González 2, 41012 Sevilla, Spain. E-mail: cutillas@us.es

authors (Gil Collado, 1949, 1960; Beaucournu & Launay, 1990; Lewis, 1993; Beaucournu & Ménier, 1998; Ménier & Beaucournu, 1998; Linardi & Guimarães, 2000; Durden & Traub, 2002; Linardi & Santos, 2012). From a morphological point of view, four subspecies of *C. felis* have been distinguished: *C. felis felis* Bouché, 1835, *C. felis strongylus* Jordan, 1925, *C. felis orientis* Jordan, 1925 and *C. felis damarensis* Jordan, 1936 (Hopkins & Rothschild, 1953). However, only a few studies have been carried out based on molecular data (Vobis *et al.*, 2004; Marrugal *et al.*, 2013; Lawrence *et al.*, 2014, 2015). Thus, some authors have suggested that further molecular studies are needed in order to resolve and elucidate the genetic diversity of *C. felis* (Lawrence *et al.*, 2014).

The ribosomal DNA segments Internal Transcribed Spacer 1 and 2 (ITS1 and 2) have been shown to be two of the best molecular markers for analysing genetic relationships at the species level in arthropods (De Rojas *et al.*, 2002, 2007; Marcilla *et al.*, 2002; Monje *et al.*, 2013). Recently, Marrugal *et al.* (2013) concluded that phylogenetic analysis based on the ITS1 region is a useful tool to approach different taxonomic and phylogenetic issues in *Ctenocephalides* species, and they found clear molecular differences between *C. felis* and *C. canis*. In addition, the 18S rRNA gene has been widely used as a molecular marker in order to clarify molecular relationships among families and subfamilies (Whiting *et al.*, 2008; Acosta & Morrone, 2013; Díaz-Nieto *et al.*, 2013).

Moreover, mtDNA markers have remained as the markers of choice in many population, biogeographic and phylogenetic studies. Although many species are still described based on morphological or morphometric characters only, mtDNA markers has also been used in taxonomic studies because all described species are given as mtDNA sequence tags or bar codes (Hebert *et al.*, 2003). Recently, Lawrence *et al.* (2014) carried out a study based on cytochrome c-oxidase subunits 1 and 2 (*cox1* and 2), to investigate the evolutionary relationships and genetic diversity of *C. felis* and other flea species from the genus *Ctenocephalides* from different geographical areas (Australia, Fiji, Thailand and Seychelles), and concluded that both markers can be used to identify species of the genus *Ctenocephalides*. Nevertheless, some authors cited that it is not safe to assume *a priori* that mtDNA evolves as a strictly neutral marker because both direct and indirect selection influence mitochondria. Thus, they questioned its utility as a marker for genomic history (Ballard & Whitlock, 2004). On the other hand, the presence of symbionts such as *Wolbachia pipientis* has resulted in cases of reduction and increases in the mtDNA genetic diversity. Thus, some authors have concluded that mtDNA on its own is an unsuitable marker for the study of recent historical events in arthropods, suggesting the development and use of microsatellites for intraspecific study, and nuclear coding genes for phylogenetic study as a requirement to reveal the history of nuclear DNA (Dean *et al.*, 2003; Shoemaker *et al.*, 2003; Hurst & Jiggins, 2005; Kodandaramaiah *et al.*, 2013).

Here we present a comparative molecular study of *C. felis* and *C. canis*, from different geographical regions (Spain, Iran and South Africa). The ITS1 and ITS2, 18S rRNA partial gene and *cox1* mtDNA partial gene were sequenced in order to assess

interpopulation and interspecific variations for clarification of the taxonomic status of these species. Furthermore, comparative phylogenetic and phylogeographic analyses with other species of fleas by phylogenetic methods (Bayesian, maximum parsimony and maximum-likelihood inference) were done. Finally, the presence of *Wolbachia pipientis* in *C. canis* and *C. felis* was checked to assess its influence on both species' evolutionary histories.

Materials and methods

Collection of samples

Fleas were collected from dogs (*Canis lupus familiaris*) from different geographical regions of Spain, South Africa and Iran (Tables 1 and 2). Single individuals were preserved in 70% ethanol until required for subsequent identification and sequencing.

Morphological identification

For morphological studies, fleas were cleared with 10% KOH (Lewis, 1993) and examined under stereomicroscope. All specimens were photographed. Morphological differentiation between *C. felis* and *C. canis* individuals was carried out according to the original descriptions (Gil Collado, 1949, 1960; Beaucournu & Launay, 1990; Lewis, 1993; Beaucournu & Ménier, 1998; Ménier & Beaucournu, 1998; Marrugal *et al.*, 2013).

Several criteria cited by different authors were used for the specific determination of the genus *Ctenocephalides* including:

- Genal ctenidium formed of eight or nine spines oriented horizontally (Lewis, 1993) and relative size of the first and second genal spines (Gil Collado, 1949; Beaucournu & Ménier, 1998; Durden & Traub, 2002; Marrugal *et al.*, 2013).
- Shape of the front of head (Gil Collado, 1949; Beaucournu & Launay, 1990; Lewis, 1993; Linardi & Santos, 2012; Marrugal *et al.*, 2013). Length/width ratio of the head (Durden & Traub, 2002; Marrugal *et al.*, 2013).
- Male genitalia: manubrium and apex (degree of dilation) (Gil Collado, 1949; Lewis, 1993; Ménier & Beaucournu, 1998; Marrugal *et al.*, 2013) and aedeagus (Ménier & Beaucournu, 1998; Marrugal *et al.*, 2013).
- Female genitalia: spermatheca and hilla (degree of elongation of the apical part of the spermatheca) (Gil Collado, 1949; Lewis, 1993; Marrugal *et al.*, 2013).
- Presence of two to three bristles on the lateral metanotal area (LMA) (Gil Collado, 1949; Beaucournu & Launay, 1990; Beaucournu & Ménier, 1998; Linardi & Santos, 2012; Marrugal *et al.*, 2013).
- Hind tibia with a number of seta-bearing notches along dorsal margin (Beaucournu & Launay, 1990; Lewis, 1993; Beaucournu & Ménier, 1998; Durden & Traub, 2002; Linardi & Santos, 2012; Marrugal *et al.*, 2013).

Table 1. GenBank accession numbers of ITS1, ITS2 and 18S rRNA partial gene sequences of individuals of *Ctenocephalides felis* and *C. canis* isolated from *Canis lupus familiaris* from different geographical regions and GenBank accession number of 16S rRNA partial gene sequence of *Wolbachia* sp.

Location/Country	Number of fleas	Number of base pairs (bp)	Species	Accession number
ITS1				
Nashtarood, Mazandaran/Iran	1	668	<i>C. felis</i>	LN827902
Pilas, Sevilla/Spain	4	668	<i>C. felis</i>	
Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	4	668	<i>C. felis</i>	
Lebrija, Sevilla/Spain	4	668	<i>C. felis</i>	
Dílar, Granada/Spain	3	668	<i>C. felis</i>	
Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	4	668	<i>C. felis</i>	
La Luisiana, Sevilla/Spain	4	668	<i>C. felis</i>	
Dos Hermanas, Sevilla/Spain	1	668	<i>C. felis</i>	
ITS2				
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain	1 (No. 113)	327	<i>C. felis</i>	LN827904
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain (Clone 1)	–	327	<i>C. felis</i>	LN864484
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain (Clone 2)	–	327	<i>C. felis</i>	
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain (Clone 3)	–	327	<i>C. felis</i>	
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain (Clone 4)	–	327	<i>C. felis</i>	
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain	2	327	<i>C. felis</i>	LN827903
Mallorca/Spain	4	327	<i>C. felis</i>	
Pilas, Sevilla/Spain	3	327	<i>C. felis</i>	
Mairena, Sevilla/Spain	5	327	<i>C. felis</i>	
Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	3	327	<i>C. felis</i>	
Lebrija, Sevilla/Spain	4	327	<i>C. felis</i>	
Dílar, Granada/Spain	4	327	<i>C. felis</i>	
Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	3	327	<i>C. felis</i>	
La Luisiana, Sevilla/Spain	3	327	<i>C. felis</i>	
Dos Hermanas, Sevilla/Spain	5	327	<i>C. felis</i>	
Nashtarood, Mazandaran/Iran	2	327	<i>C. felis</i>	
Polokwane, Limpopo/South Africa	8	327	<i>C. felis</i>	
Tonekabon, Mazandaran/Iran	1	327	<i>C. canis</i>	LN827905
Kotra, Mazandaran/Iran	2	327	<i>C. canis</i>	
Kotra, Mazandaran/Iran (Clone 1)	–	327	<i>C. canis</i>	LN864485
Kotra, Mazandaran/Iran (Clone 2)	–	327	<i>C. canis</i>	
Kotra, Mazandaran/Iran (Clone 5)	–	327	<i>C. canis</i>	
Kotra, Mazandaran/Iran (Clone 3)	–	327	<i>C. canis</i>	LN864486
Kotra, Mazandaran/Iran (Clone 4)	–	327	<i>C. canis</i>	LN864487
18S rRNA gene				
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain	2	989	<i>C. felis</i>	LN651166
Mallorca/Spain	2	989	<i>C. felis</i>	
Pilas, Sevilla/Spain	2	989	<i>C. felis</i>	
Mairena, Sevilla/Spain	2	989	<i>C. felis</i>	
Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	1	989	<i>C. felis</i>	
Dílar, Granada/Spain	1	989	<i>C. felis</i>	
Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	1	989	<i>C. felis</i>	
La Luisiana, Sevilla/Spain	1	989	<i>C. felis</i>	
Kotra, Mazandaran/Iran	1	989	<i>C. felis</i>	
Polokwane, Limpopo/South Africa	2	989	<i>C. felis</i>	
Kotra, Mazandaran/Iran	1	989	<i>C. canis</i>	LN651167
16S rRNA gene				
<i>Wolbachia pipientis</i>	334			LN864488

Table 2. GenBank accession numbers of *coxI* partial gene sequences (600 bp) of individuals of *Ctenocephalides felis* and *C. canis* isolated from *Canis lupus familiaris* from different geographical regions.

Number identifier	Location/Country	<i>Wolbachia pipientis</i>	Gender	Haplotype	Accession Number
<i>CoxI Ctenocephalides felis</i>					
102	Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain	–	M	A	LN827896
31	Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain	–	M	A	
28	Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain	+	H	A	
223	Mairena, Sevilla/Spain	+	H	A	
228*	Mairena, Sevilla/Spain	–	M	A	
221	Mairena, Sevilla/Spain	+	H	A	
219	Mairena, Sevilla/Spain	+	H	A	
218	Mairena, Sevilla/Spain	–	H	A	
338*	Mallorca/Spain	+	H	A	
332	Mallorca/Spain	+	H	A	
330	Mallorca/Spain	+	H	A	
199	Kotra, Mazandaran/Iran	+	H	A	
200	Kotra, Mazandaran/Iran	+	H	A	
269	Nashtarood, Mazandaran/Iran	–	M	A	
271	Nashtarood, Mazandaran/Iran	–	M	A	
609	Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	+	H	A	
615	Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	+	H	A	
601	Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	+	H	A	
612	Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	+	H	A	
481	Pilas, Sevilla/Spain	+	M	A	
478	Pilas, Sevilla/Spain	+	H	A	
479	Pilas, Sevilla/Spain	+	H	A	
477	Pilas, Sevilla/Spain	–	M	A	
3	Dílar, Granada/Spain	–	M	A	
4	Dílar, Granada/Spain	+	H	A	
5	Dílar, Granada/Spain	+	H	A	
120	Lebrija, Sevilla/Spain	–	M	A	
118*	Lebrija, Sevilla/Spain	+	H	A	
643	Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	+	H	A	
647	Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	+	H	A	
644	Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	+	H	A	
617	La Luisiana, Sevilla/Spain	–	H	A	
619*	La Luisiana, Sevilla/Spain	+	H	A	
620*	La Luisiana, Sevilla/Spain	–	H	A	
222	Mairena, Sevilla/Spain	+	H	A1	LN827897
642	Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	+	H	A2	LN827898
216*	Mairena, Sevilla/Spain	+	H	B	LN827899
645*	Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	+	H	B	
595	Polokwane, Limpopo/South Africa	–	M	C	LN827900
591	Polokwane, Limpopo/South Africa	+	H	C	
589	Polokwane, Limpopo/South Africa	+	H	C	
586	Polokwane, Limpopo/South Africa	+	H	C	
548	Polokwane, Limpopo/South Africa	+	H	C	
491	Polokwane, Limpopo/South Africa	+	H	C	
487	Polokwane, Limpopo/South Africa	+	H	C	
<i>CoxI Ctenocephalides canis</i>					
197	Kotra, Mazandaran/Iran	+	H	–	LN827901
204	Nashtarood, Mazandaran/Iran	+	H	–	
214	Kotra, Mazandaran/Iran	+	H	–	
198	Kotra, Mazandaran/Iran	+	H	–	

Asterisks indicate individuals which showed two and three bristles in each side on the lateral metanotal area of one individual.

Molecular study

Fleas were frozen individually in liquid nitrogen and pulverized in a mortar. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol and was checked in a 0.8% agarose gel electrophoresis using ethidium bromide.

All molecular markers sequenced in this study were amplified by PCR using a thermocycler (Eppendorf AG). The PCR mix, PCR conditions and PCR primers are summarized in Table S1.

All sequenced fleas were screened for *Wolbachia* sp. using specific *16S* rRNA gene primers (see Table S1). As positive control, DNA from *Wolbachia pipientis* (AN: LN864488) derived from *C. felis* from Spain was available, whereas for negative controls, we used DNA from *Stenoponia tripectinata tripectinata* negative for *Wolbachia pipientis*. Negative and positive controls were tested after every PCR reaction sets. Sequences obtained were compared with those in the GenBank DNA database by using the program BLAST (v2.0, National Center for Biotechnology Information; available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). (Altschul *et al.*, 1990). The ITS1, ITS2, *18S* rRNA partial gene and *cox1* partial gene sequences obtained from *C. felis* and *C. canis* and *16S* rRNA of *Wolbachia pipientis* gene were deposited in GenBank (Table 1).

The PCR products were checked on ethidium bromide stained 2% Tris–Borate–EDTA (TBE) agarose gels. Bands were eluted and purified from the agarose gel by using the QWizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, Madison, WI, U.S.A.). Once purified, the products were sequenced by Stab Vida (Caparica, Portugal). All the phylogenetic analyses were performed on the rDNA and mtDNA datasets, and sequences were aligned using the Clustal X program v2.0 (Larkin *et al.*, 2007).

The rDNA intra-individual variation was determined by sequencing four to five clones of one individual per geographical population of *C. felis* and *C. canis*. The PCR products were eluted from the agarose by using the WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and transformation was carried out as described by Cutillas *et al.* (2009). Plasmids were purified using a Wizard Plus SV (Promega) and sequenced by Stab Vida (Portugal) with a universal primer (M13).

A restriction map of the *cox1* sequences of *C. felis* and *C. canis* was constructed using The Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000; available at http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html).

Phylogenetic trees were inferred using nucleotide data and produced using three methods: maximum parsimony (MP) trees generated using the MEGA 5 program from Tamura *et al.* (2011); maximum-likelihood (ML) using the PHYML package from Guindon & Gascuel (2003); and Bayesian inferences (B) performed in Mr Bayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). The JMODELTEST (Posada, 2008) program was used to determinate the best-fit substitution model for the parasite data (*18S*, ITS1, ITS2 and *cox1*). Models of evolution were chosen for subsequent analyses according to the Akaike Information Criterion (Huelsenbeck & Rannala, 1997; Posada & Buckley, 2004). For the study of the four concatenated datasets

(*cox1*, ITS1, ITS2 and *18S*), a combined partitioned analysis was performed using the model-jumping option in Mr Bayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). For ML inference, best-fit nucleotide substitution models included a general time-reversible model with gamma-distributed rate variation and a proportion of invariable sites, GTR + I + G (*18S*), Hasegawa-Kishino-Yano, HKY85 + I + G (ITS1) and a general time-reversible model with gamma-distributed rate variation GTR + G (ITS2 and *cox1*). Support for the topology was examined using bootstrapping (heuristic option) (Felsenstein, 1985) over 1000 replications to assess the relative reliability of clades. Models selected by jModeltest for BI nst = 6 with invgamma rates (*18S*), nst = 2 with invgamma rates (ITS1) and nst = 6 with gamma rates (ITS2 and *cox1*). For BI, the standard deviation of split frequencies was used to assess whether the number of generations completed was sufficient; the chain was sampled every 500 generations and each dataset was run for 10 million generations. Burn-in was determined empirically by examination of the log likelihood values of the chains. The Bayesian posterior probabilities (BPP) were percentage converted.

NETWORK (v4.6.1.3) was used to create interpopulation and interspecific median-joining networks (Bandelt *et al.*, 1999; available at <http://www.fluxus-engineering.com>), to visualize the evolutionary relationships between *cox1* haplotypes. This approach has been shown to yield the best-resolved genealogies relative to other rooting and network procedures (Cassens *et al.*, 2003).

The phylogenetic and phylogeographic analysis, based on ITS1, ITS2, *18S* rRNA and *cox1* mtDNA sequences, was carried out using our sequences and those obtained from GenBank database (Appendix S1). Phylogenetic trees based on *18S* rRNA and *cox1* mtDNA were rooted on outgroup species representing the Order Mecoptera: *Microchorista philpotti* and *Boreus elegans* (*cox1*), *Panorpa striata* and *Neopanorpa harmandi* (*18S* rRNA) and comparatively studied with other species of fleas (see Figures S1, S3 and Appendix S1). No ITS sequences of Order Mecoptera were found in any public database; thus, phylogenetic trees with other Siphonaptera species based on ITS1 and ITS2 sequences were constructed using different outgroup species representing members of Order Diptera – *Anopheles farauti* and *Anopheles arabiensis* (concatenated *18S*, ITS1, ITS2 and *cox1*).

Results

Morphological results

Two species of fleas were identified from *Canis lupus familiaris*: *Ctenocephalides felis* and *C. canis* (Tables 1 and 2); the latter was collected only on dogs from Iran (Table 1). Some individuals characterized as *C. felis* (Table 2) showed several characters typical of *C. canis* such as presence of two single, short and strong spines located between post-medial and apical spines and presence of 2 and/or 3 bristles on LMA. These morphological variations could be found on both sides or/and on one side of the thorax, indistinctly.

18S rRNA partial gene analysis

18S rRNA partial gene sequences of all individuals from different geographical areas were 989 base pairs (bp) in length. A total of 16 sequences corresponding to 15 individuals of *C. felis* and one individual of *C. canis* were obtained (Table 1). No differences were observed between *18S* rRNA partial gene sequences from both species.

A phylogenetic tree topology obtained using *18S* rRNA partial gene sequences of *C. felis* and *C. canis* and other sequences from different species of fleas retrieved from GenBank (see Appendix S1) showed that *C. felis* and *C. canis* clustered together, with high bootstrap and BPP values (Figure S1). They were in polytomy with *Echidnophaga iberica*, *Echidnophaga gallinacea*, *Pulex irritans*, *Spilopsyllus cuniculi*, *Parapulex cheprensis*, *Xenopsylla cunicularis* and *Xenopsylla cheopis* (Pulicidae).

Internal Transcribed Spacer 1 and 2 (ITS1 and ITS2) analysis

The length of the ITS1 region of *C. felis* isolated from dogs from different localities was 668 bp (Table 1). A total of 25 fleas were sequenced to carry out the phylogenetic analysis. No interpopulation variations in *C. felis* from different geographical areas were detected. However, when the ITS1 sequences of *C. felis* were compared with *C. canis* sequences, 44 different base pairs and 11 gaps were obtained (91.9% interspecific similarity).

A total of 47 *C. felis* and 3 *C. canis* ITS2 fragments were sequenced from fleas from different localities (Table 1). They were 327 bp in length (Table 1). When the ITS2 sequences of *C. felis* and *C. canis* were compared, a total of 12 different base pairs were detected with 96.3% interspecific similarity (Figure S2). Intrapopulation variation was not detected when *C. canis* sequences of different individuals were compared, whereas only one mutation was shown in one specimen of *C. felis* (no. 113 from Sanlúcar de Barrameda, Cádiz, Spain) when those sequences were compared. The intra-individual variability was studied in five clones of one individual of *C. canis* isolated from *C. l. familiaris* from Iran. The intra-individual similarity ranged from 99.1 to 100% (Appendix S1). In relation to *C. felis*, the intra-individual similarity was studied in four clones of one individual isolated from *C. l. familiaris* from Sanlúcar de Barrameda, Cádiz (Spain). However, no differences were observed among them (intra-individual similarity 100%) (Data not shown).

The phylogenetic analysis of the ITS1 and ITS2 sequences of *C. canis* and *C. felis* with different species of Siphonaptera showed a substantial length variation in the alignment which compromised inferences of positional homology. In addition, species of the Order Diptera were useless as outgroups.

Cox1 mtDNA partial gene analysis

The *cox1* mtDNA partial gene sequences of *C. felis* and *C. canis* were 600 bp in length. A total of 49 sequences were

obtained from individuals from different localities and countries (Table 2). Intra-specific variation was not detected when *cox1* sequences of *C. canis* were compared. However, when *C. felis* sequences were analysed, five different haplotypes were obtained (A, A1, A2, B and C) (Table 2). Haplotype A was the most common and included individuals from all geographical areas analysed except from South Africa (Haplotype C). Haplotype B, however, was observed only in two individuals from Fuentes de Andalucía (Sevilla, Spain) and Mairena (Sevilla, Spain) (216 and 645 sequences, respectively) (Table 2).

A comparative study among all the *cox1* mtDNA partial gene sequences of *C. felis* and *C. canis* from different geographical areas obtained in this work was carried out (Table 3). Only one different base pair was noticed between haplotype A and A1 and between haplotype A and A2 (99.8% similarity). Nevertheless, a maximum of 16 differences were observed between haplotype A and haplotype B and C (97.3% similarity) (Table 3). Surprisingly, haplotype B and C displayed only a slight difference in respect to *C. canis* from Iran (99.3 and 99.7% similarity, respectively), whereas a 97.7% similarity was observed between haplotype A and *C. canis* from Iran. Furthermore, our sequences were analysed and compared with other *cox1* mtDNA partial gene sequences of *C. f. felis*, *C. f. strongylus*, *C. orientis* and *C. canis* isolated from different geographical areas obtained from GenBank. Lowest values of similarity were observed when *C. canis* from Czech Republic and *C. orientis* were compared with the rest of *Ctenocephalides* species (Table 3).

The phylogenetic tree inferred from *cox1* partial gene sequences of *C. felis* and *C. canis* showed that *Ctenocephalides* species clustered together with high bootstrap and BPP values. Three different subclades could be observed within the genus *Ctenocephalides*. The first clade clustered all individuals corresponding to *C. canis* from the Czech Republic and *C. orientis*. The second clade clustered *C. felis* (haplotypes B and C) together with *C. canis* from Iran and *C. f. felis* from Queensland, Cairns (Australia) (Figure S3). The third clade included *C. felis* haplotypes A, A1 and A2, together with *C. f. felis* from Fiji, Thailand, Mumbai (India), Pardubice and Jablonec Nad Nisou (Czech Republic), Sikkim (India) and New South Wales (Australia). *Ctenocephalides felis strongylus* appeared in polytomy between clades 2 and 3. Other species of the family Pulicidae (*P. irritans*, *Echidnophaga gallinacea*, *E. myrmecobii* and *S. cuniculi*) appeared separated from *Ctenocephalides* species.

Based on *cox1* sequences, restriction mapping identified many endonucleases that could be used to delineate the haplotypes found in this study. Thus, *SacI*, *SseI* and *TaqI* sites were present in the sequences of *C. felis* haplotypes A, A1 and A2, but not in *C. felis* haplotypes B and C nor *C. canis*. *HpaII* and *MspI* presented one restriction site in *C. canis* and in *C. felis* haplotypes B and C but none in *C. felis* haplotype A, A1 and A2. Furthermore, *DraI* sites were present only in the sequences of *C. canis* and *C. felis* haplotype C, whereas *BclI* presented two restriction sites only in *C. felis* haplotype A, A1, A2 and C.

The concatenated dataset of *18S* partial gene, ITS1, ITS2 and *cox1* partial gene sequences included 3093 aligned sites and 25 taxa, including outgroups. Phylogenetic analyses of the concatenated dataset yielded a strongly supported tree (Fig. 1).

Table 3. Percentage of similarity among all the *cox1* mtDNA partial gene sequences of *Ctenocephalides felis* and *C. canis* from different geographical areas obtained in this work and from GenBank.

<i>cox1</i>	<i>C. felis</i> haplotype A and <i>C. felis</i> from New South Wales (Australia)	<i>C. felis</i> haplotype A1	<i>C. felis</i> haplotype A2	<i>C. felis</i> haplotype B	<i>C. felis</i> haplotype C (South Africa)	<i>C. canis</i> from Iran	<i>C. felis strongylus</i>	<i>C. orientis</i>	<i>C. felis</i> from Queensland, Cairns (Australia)	<i>C. felis felis</i> from Thailand and Mumbai (India)	<i>C. felis felis</i> from Sikkim (India)	<i>C. felis felis</i> from Jablonec nad Nisou (Czech Republic)	<i>C. felis felis</i> from Pardubice (Czech Republic)	<i>C. canis</i> from Czech Republic
<i>C. felis</i> haplotype A and <i>C. felis</i> from New South Wales (Australia)	–													
<i>C. felis</i> haplotype A1	99.8%	–												
<i>C. felis</i> haplotype A2	99.8%	99.7%	–											
<i>C. felis</i> haplotype B	97.3%	97.5%	97.2%	–										
<i>C. felis</i> haplotype C (South Africa)	97.3%	97.5%	97.2%	99%	–									
<i>C. canis</i> from Iran	97.7%	97.8%	97.5%	99.3%	99.7%	–								
<i>C. felis strongylus</i>	98%	98.2%	97.8%	98%	97.7%	98%	–							
<i>C. orientis</i>	91.3%	91.5%	91.2%	91.8%	91.5%	91.8%	91.7%	–						
<i>C. felis felis</i> from Queensland, Cairns (Australia)	97.3%	97.5%	97.2%	98.7%	98.3%	98.7%	97.7%	92.3%	–					
<i>C. felis felis</i> from Fiji, Thailand and Mumbai (India)	98.3%	99%	98.7%	97.8%	97.8%	98.2%	98.5%	92%	98.2%	–				
<i>C. felis felis</i> from Sikkim (India)	99.7%	99.5%	99.5%	97.3%	97.5%	97.7%	98%	92.3%	97.5%	98.8%	–			
<i>C. felis felis</i> from Jablonec nad Nisou (Czech Republic)	100%	99.8%	99.8%	97.3%	97.3%	97.7%	98%	91.3%	97.3%	98.8%	99.7%	–		
<i>C. felis felis</i> from Pardubice (Czech Republic)	98.8%	98.7%	98.7%	97.5%	97.5%	97.8%	98.2%	92.2%	97.8%	99%	98.7%	98.8%	–	
<i>C. canis</i> from Czech Republic	91.5%	91.7%	91.5%	91.2%	90.8%	91.2%	91.2%	95.5%	91.7%	91.5%	92.7%	91.5%	91.7%	–

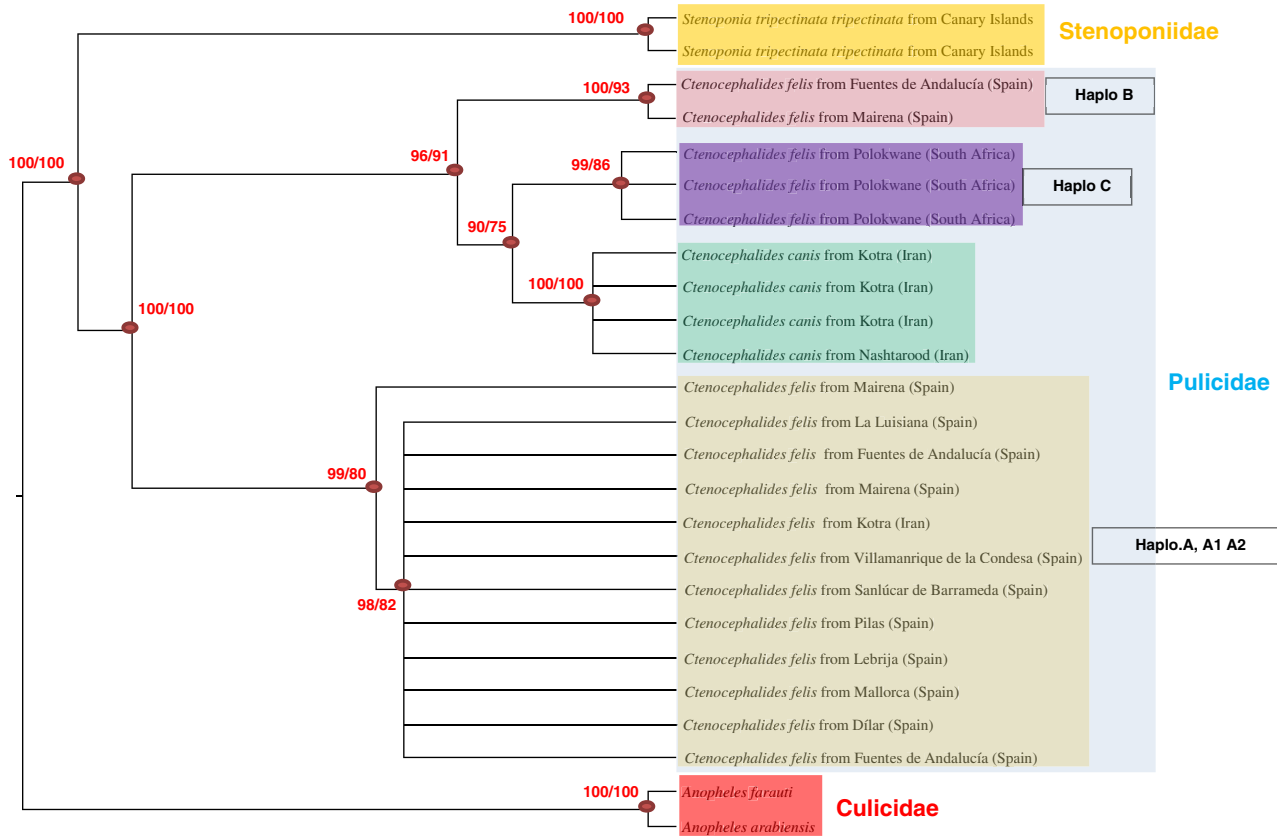


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from different geographical origins (see Tables 1 and 2) based on concatenated 18S ribosomal RNA partial gene, Internal Transcribed Spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2) and cytochrome c-oxidase 1 (*cox1*) partial gene of mitochondrial DNA inferred using the Bayesian (B) and maximum-likelihood (ML) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown on the branches (B/ML). Bayesian posterior probabilities (BPP) are percentage-converted.

The analyses of concatenated sequences are concordant with the *cox1* tree topology. Thus, haplotypes A, B and C clustered in three different clades, showing haplotypes B and C related to *C. canis* (Fig. 1).

The network of the 42 sequences of *Ctenocephalides* populations showed a general congruence with the phylogenetic reconstruction. The minimum spanning network showed the three main groups defined above and separated from each other by a genetic distance of 9–41 mutational steps (Fig. 2). Clade 1 clustered *C. orientis* and *C. canis* from the Czech Republic; both species seem to be more closely related to each other than to any other haplotype (26 mutational steps). The second clade grouped *C. felis* (haplotypes B and C) together with *C. canis* (Iran) and *C. f. felis* (Australia). Nevertheless, *C. canis* (Iran) seems to be close to *C. f. felis* (Haplotype C) with 1 mutational step. Clade 3 clustered *C. felis* (Haplotypes A, A1 and A2) together with *C. f. felis* from India, the Czech Republic and Australia. A majority haplotype (H1, haplotype A) was observed including 14 individuals (*C. felis* from Spain and *C. f. felis* from Australia and the Czech Republic). Haplotype A1 (H2) and A2 (H3) appeared related to the majority haplotype of *C. felis* (H1) separated with 1 mutational step in both cases (Fig. 2).

Because *Wolbachia* sp. has been studied thoroughly because of its influence on the host's mtDNA variability, the presence of this bacterium was tested in all fleas studied. All of the PCR products obtained were sequenced and the length of the 16S rRNA gene region was 334 bp. BLAST analysis showed 99–100% homology to *Wolbachia pipientis* 16S rRNA (Genbank accession number AY026912).

Discussion

Genus and species determination of fleas is generally based on a variety of morphological criteria (Lane & Crosskey, 1993; Kramer & Mencke, 2001; Mehlhorn, 2001; Linardi & Santos, 2012). However, a few studies have been carried out on molecular differentiation of fleas. That means we have a great knowledge of flea taxonomy at the species and subspecies level, and enough information to assess their biology and role in disease transmission, which has been studied worldwide in recent years. In contrast, a rigorous exploration of the phylogenetic relationships among fleas is needed in order to clarify their complex systematics (Whiting *et al.*, 2008).

- Ctenocephalides felis felis* (Australia)
- Ctenocephalides felis felis* (Fiji)
- Ctenocephalides canis* and *C. felis* (Iran)
- Ctenocephalides felis strongylus*
- Ctenocephalides felis* (South Africa)
- Ctenocephalides felis felis* (India)
- Ctenocephalides felis* (Spain)
- Ctenocephalides orientis*
- Ctenocephalides felis felis* and *C. canis* (Czech Republic)
- Ctenocephalides felis felis* (Thailand)

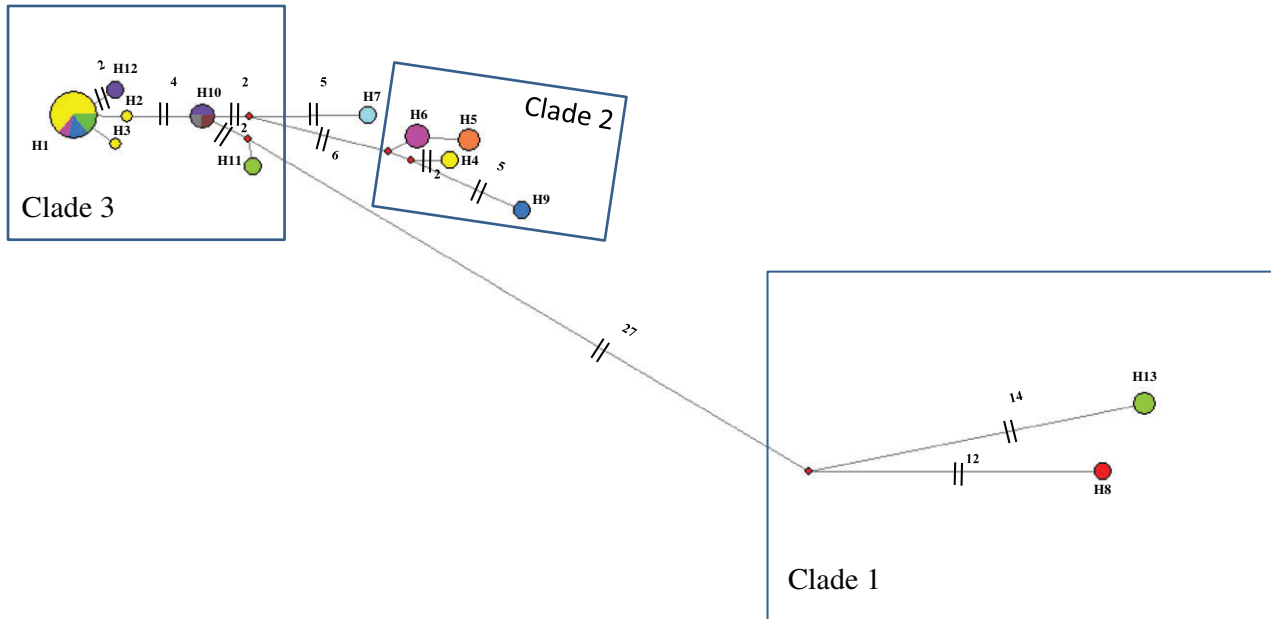


Fig. 2. A minimum spanning network constructed using 42 haplotypes of mitochondrial *cox1* partial gene sequences of *Ctenocephalides* spp. The geographical origin for each haplotype is shown in Table 2. The sizes of the circles are proportional to the number of haplotypes represented and the numbers correspond to the mutational steps observed between haplotypes. H1 (14): *C. felis* from Spain and Iran (Haplo A), *C. felis felis* from Australia and the Czech Republic; H2 (1): *C. felis* from Spain (Haplo A1); H3 (1): *C. felis* from Spain (Haplo A2); H4 (2): *C. felis* from Spain (Haplo B); H5 (3): *C. felis* from South Africa (Haplo C); H6 (4): *C. canis* from Iran; H7 (2): *C. felis strongylus*; H8 (2): *C. orientis*; H9 (2): *C. felis felis* from Australia; H10 (4): *C. felis felis* from India, Thailand and Fiji; H11 (2): *C. felis felis* from the Czech Republic; H12 (2): *C. felis felis* from India; H13 (3): *C. canis* from the Czech Republic. [Colour figure available on the online version on Wiley Online Library.]

The morphological study of fleas from dogs from different geographical regions revealed the existence of two species: *C. felis* and *C. canis*. *Ctenocephalides felis* showed morphological variations. This fact has been cited by different authors. Thus, in *Ctenocephalides* spp. the most frequent morphological variations are observed in combs and chaetotaxies of LMA and in hind tibia (Amin *et al.*, 1974; Amin, 1976; Linardi & Santos, 2012). These alterations in chaetotaxy on the LMA and metatibia have been justified by different authors (Holland, 1949; Fox, 1952; Amin *et al.*, 1974; Amin, 1976) as the existence of hybridization between *C. felis* and *C. canis*. However, the hypothesis of hybridization between both species must be rejected because commonly species do not cross each other, as reinforced by Beaucournu & Guiller (2006). Sometimes, specimens exhibiting variations have been treated improperly as hybrids, in spite of the nonexistence of the two species in the same municipality or region. In our case, the individuals

exhibiting these ‘abnormalities’ were collected from southern Spain and Mallorca, where only *C. felis* has been detected (Table 2). Furthermore, these alterations in chaetotaxy on the LMA did not correspond with a determined *cox1* haplotype (see asterisk, Table 2).

Our studies are in agreement with those of Linardi & Santos (2012), who concluded that the separation of the two species of *Ctenocephalides* must be based on all characteristics. Data on hosts, geographical distribution and prevalence of infestation may support the identification of the species. In *C. felis* four subspecies have been proposed on the basis of rather minor morphological differences (Hopkins & Rothschild, 1953; Haeuselbarth, 1966). Analysis of several genomic sequences of these species which show high variation can be helpful to assess the validity and significance of such infraspecific taxa and in investigating evolutionary relationships within and between species (Vobis *et al.*, 2004).

In the present work, *C. felis* and *C. canis* isolated from *C. l. familiaris* from different geographical areas were also analysed by amplification and sequencing of ribosomal (ITS1, ITS2 and 18S rRNA partial gene) and mitochondrial (*cox1* mtDNA partial gene) markers.

The comparative molecular study based on ITS1 sequences of *C. felis* within a geographical region and from different geographical origins showed a 100% similarity. These results are in agreement with those of Vobis *et al.* (2004) and Marrugal *et al.* (2013), who found that the ITS1 nucleotide sequences of different *C. felis* populations from different geographical areas are practically identical. Nevertheless, other authors such as Gamerschlag *et al.* (2008) reported different lengths in the ITS1 nucleotide sequences in other species of fleas (*Tunga penetrans* from Africa and South America).

On the other hand, the comparison between *C. canis* and *C. felis* ITS1 sequences revealed a clear interspecific variability. These results are in agreement with Marrugal *et al.* (2013), who concluded that the ITS1 region is a useful marker to approach different taxonomic statements in the genus *Ctenocephalides*.

The ITS2 sequences of *C. felis* and *C. canis* were markedly shorter than ITS1. This fact was reported by Vobis *et al.* (2004) in *C. felis*; however, these authors did not sequence the ITS2 region of *C. canis* and we could not compare our data with theirs. The ITS2 sequence of *C. canis* has been reported for the first time in the present study. With regard to our results, we can conclude that the analysis of ITS2 fragment constitutes a useful tool for the differentiation of both *Ctenocephalides* species. There was no interpopulation variation whereas intrapopulation similarity ranged from 99.6 to 100% in both species. This result disagrees with that of Luchetti *et al.* (2007) who found two genotypic groups (Atlantic and Pacific) in *Tunga penetrans*. Nevertheless, the peculiar evolutionary dynamics of ITS2, which is a repeated sequence embodied of rDNA, is well-known. Therefore, this molecular marker has evolved in a concerted way (Smith, 1976). This pattern is carried out through population dynamics processes and intragenomic unequal DNA exchanges (molecular drive; Dover, 2002). Our results confirm this evolutionary process in fleas, whereby no marked differences were observed even between different geographical populations. This phenomenon was reported recently by Zurita *et al.* (2015) in *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera) from the Canary Islands and in Diptera species by Monje *et al.* (2013). In conclusion, ITS1 and ITS2 sequences do not determine different populations within one species of the genus *Ctenocephalides*; however, the analyses of both rDNA markers are a helpful tool for differentiation at the species level.

The 18S rRNA partial gene sequences confirmed the low value of this marker for phylogenetic studies at the species level. Thus, we could observe the existence of polytomy within the genus *Ctenocephalides* and other species of the family Pulicidae. This fact is in agreement with Whiting *et al.* (2008). No differences were observed between *C. felis* and *C. canis*.

The *cox1* mtDNA sequences of *C. felis* revealed five different haplotypes: A, A1, A2, B (individuals from Spain and Iran) and C (individuals from South Africa). However, no different

haplotypes were observed in *cox1* mtDNA sequences of *C. canis* from Iran. In addition, several specific recognition sites for endonucleases were detected in order to differentiate *C. felis* and *C. canis*, and to differentiate the *C. felis* haplotypes. Thus, *SacI*, *SstI*, *TaqI*, *DraI*, *BclI*, *HpaII* and *MspI* sites have diagnostic value for specific determination in *C. felis* and *C. canis*.

The phylogenetic tree of the *cox1* sequences revealed three different clades within the genus *Ctenocephalides*. The diversity showed even within individuals of *C. felis* from the same geographical origins, for example, Fuentes de Andalucía (Haplotypes B, A and A2) or Mairena (Haplotypes A, A1 and B) (Table 2) is in agreement with Lawrence *et al.* (2014), who found different haplotypes in *C. f. felis* from Australia. In our case, we found a dominant *C. felis* group including sequences from the Czech Republic, Australia, India, Iran, Thailand, Fiji and Spain (haplotypes A, A1 and A2) clustering in the same clade, whereas haplotypes B and C clustered with *C. canis* in another clade (Figure S3). Thus, we found individuals of *Ctenocephalides* defined as *C. felis* by ITS1 and ITS2 sequences but showing *cox1* partial gene sequences of *C. canis*. The phylogenetic tree of the concatenated 18S, ITS1, ITS2 and *cox1* sequences corroborated these results (Fig. 1). This diversity could be explained by the presence of the symbiont *Wolbachia pipientis*. This bacterium is very common in arthropods, and in recent years has been thoroughly studied because of its influence on the host's mtDNA variability.

Some authors (Schulenburg *et al.*, 2000; Behura *et al.*, 2001; Shoemaker *et al.*, 2003) have reported the presence of two or more haplotypes associated with this bacterium in some species, such as *Adalia bipunctata* (Coleoptera), *Drosophila mauritania* (Diptera) or *Solenopsis invicta* (Hymenoptera). If a population becomes infected with a symbiont such as *Wolbachia pipientis* that has sufficient drive to spread, the mtDNA type associated with the initial infection will hitchhike through the population and further the ability of symbionts to spread between populations by occasional movements of hosts setting up a process named 'indirect selection on the mtDNA' (Hurst & Jiggins, 2005). In agreement with former studies in the Order Diptera (Monnerot *et al.*, 1990; Rousset & Solignac, 1995), we suggest that there has been introgression of *C. canis cox1* mtDNA into *C. felis* by *Wolbachia pipientis*. According to Shaw (2002) it is possible that symbiont-driven introgression may explain cases where mtDNA phylogenetic conflicts with those obtained from nuclear DNA. The spread of the introgressed symbiont would be associated with the spread of introgressed mtDNA, homogenizing mtDNA variation across the species (Hurst & Jiggins, 2005).

Furthermore, *C. orientis*, often regarded as a subspecies of *C. felis*, should gain full species status because it forms a sister clade to *cox1* sequences of *C. canis* from the Czech Republic. This is in agreement with Lawrence *et al.* (2015). Nevertheless, the *cox1* sequences of *C. canis* from Iran appeared separated from those sequences but clustering with haplotypes B and C of *C. felis*. The network obtained for all the haplotypes corroborated the phylogenetic results (Figure S3 and Fig. 1).

In conclusion, we have found morphological variations in *C. felis* which do not correspond with molecular differences. The analysis of the 18S rRNA partial gene is not a useful

tool to discriminate *C. canis* and *C. felis*, whereas ITS1 and ITS2 assessed for specific determination in the genus *Ctenocephalides*. The *cox1* mtDNA sequences of *C. felis* revealed five different haplotypes and we suggest a possible introgression of *C. canis cox1* mtDNA into *C. felis* by *Wolbachia pipientis*. The presence of symbionts, such as *Wolbachia pipientis* should be checked in species of arthropods showing reduced or increased mtDNA diversity because these symbionts confound the inference of an organism's evolutionary history from mtDNA data (Hurst & Jiggins, 2005).

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article under the DOI reference: 10.1111/syen.12174

Appendix S1. List of taxa used in the analysis, including GenBank accession numbers and host information.

Figure S1. Phylogenetic tree of *Ctenocephalides felis* and *C. canis* from different geographical origins (see Table 1) based on the 18S ribosomal RNA partial gene inferred using the Bayesian (B), maximum-likelihood (ML) and maximum parsimony (MP) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown on the branches (B/ML/MP). Bootstrap values lower than 60% are not shown. Bayesian posterior probabilities (BPP) are percentage converted.

Figure S2. Alignment of the consensus nucleotide sequences of the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) of *Ctenocephalides felis* and *C. canis* isolated from *Canis lupus familiaris* (gaps generated using the Clustal W alignment program).

Figure S3. Phylogenetic tree of *Ctenocephalides felis* and *C. canis* from different geographical origins (see Table 2) based on the cytochrome *c*-oxidase 1 (*cox1*) partial gene of mitochondrial DNA inferred using the the Bayesian (B), maximum-likelihood (ML) and maximum parsimony (MP) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown on the branches (B/ML/MP). Bootstrap values lower than 60% are not shown. Bayesian posterior probabilities (BPP) are percentage converted.

Table S1. PCR mix, primers and conditions used for each molecular marker sequenced in this study.

Acknowledgement

The present work was supported by a grant of the V Plan Propio de Investigación of the University of Sevilla, Spain. Thanks to

Biodiversity Research Chair (University of Limpopo; Professor Wilmiën J. Luus-Powell) for funding the fieldwork in South Africa, to Firouz-Farideh for partly funding fieldwork in Iran and Pietersburg Veterinary Clinic (Polokwane, South Africa) for providing some of the samples. We thank Mrs Anne Kendall for her critical reading of the manuscript.

References

- Acosta, R. (2010) Five new Mexican Species of the Flea Genus *Strep-sylla* Traub, 1950 (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Neopsyllinae: Phalacroscyllini) with a phylogenetic analysis. *Journal of Parasitology*, **96**, 285–298.
- Acosta, R. & Morrone, J.J. (2013) Phylogenetics of the tribe Phalacroscyllini (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Neopsyllinae) based on molecular and morphological evidence. *Zootaxa*, **3630**, 333–346.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403–410.
- Amin, O.M. (1976) Host associations and seasonal occurrence of fleas from Southeastern Wisconsin mammals with observations on morphologic variations. *Journal of Medical Entomology*, **13**, 179–192.
- Amin, O.M., Wells, T.R. & Gately, H.L. (1974) Comb variations in the cat flea, *Ctenocephalides f. felis* (Bouché). *Annals of the Entomological Society of America*, **67**, 831–834.
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**, 729–744.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Beaucournu, J.C. & Guiller, A. (2006) Réponse à l'article "Keine molekularbiologischen Anzeichen für Unterarten beim Katzenfloh *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Ctenocephalidae)" par H Mehlhorn, J D'Haese, M Vobis & N Mencke: *Entomologia Generalis* 27: 295-301 [2005]. *Entomologia Generalis*, **28**, 311–315.
- Beaucournu, J.C. & Launay, H. (1990) *Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental, Faune de France*, Vol. **76**. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris.
- Beaucournu, J.C. & Ménier, K. (1998) Le genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasite*, **5**, 3–16.
- Behura, S.K., Sahu, S.C., Mohan, M. & Nair, S. (2001) *Wolbachia* in the Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason): correlation between host mitotypes and infection status. *Insect Molecular Biology*, **10**, 163–171.
- Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M.F. & Raoult, D. (2010) Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, **14**, 667–676.
- Cassens, I., Van Waerebeek, K., Best, P.B., Crespo, E.A., Reyes, J. & Milinkovitch, M.C. (2003) The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Molecular Ecology*, **12**, 1781–1792.
- Cutillas, C., Callejón, R., de Rojas, M., Tewes, B., Ubeda, J.M., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2009) *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica*, **111**, 299–307.
- Dean, M.D., Ballard, K.J., Glass, A. & Ballard, J.W.O. (2003) Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics*, **165**, 1959–1969.
- De Rojas, M., Mora, M.D., Ubeda, J.M., Cutillas, C., Navajas, M. & Guevara, D.C. (2002) Phylogenetic relationships in rhinonyssid mites (Acari: Rhinonyssidae) based on ribosomal DNA sequences: insights for the discrimination of closely related species. *Parasitology Research*, **88**, 675–681.

- De Rojas, M., Úbeda, J.M., Cutillas, C., Mora, D., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2007) Utility of ITS1-5.8S-ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the genus *Rhinonyssus*: the *Rhinonyssus coniventris* complex. *Parasitology Research*, **100**, 1041–1046.
- Díaz-Nieto, L.M., Maciá, A., Parisi, G., Farina, J.L., Vidal-Domínguez, M.E., Perotti, M.A. & Berón, C.M. (2013) Distribution of mosquitoes in the south east of Argentina and first report on the analysis based on 18S rDNA and *COI* sequences. *PLoS ONE*, **8**, e75516.
- Dobler, G. & Pfeffer, M. (2011) Fleas as parasites of the family Canidae. *Parasites & Vectors*, **4**, 139.
- Dover, G.A. (2002) Molecular drive. *Trends in Genetics*, **18**, 587–589.
- Durden, L.A. & Traub, R. (2002) *Medical and Veterinary Entomology*, Vol. 7. Academic Press, San Diego, California.
- Eisen, R.J. & Gage, K.L. (2012) Transmission of flea-borne zoonotic agents. *Annual Review of Entomology*, **57**, 61–82.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299.
- Fox, I. (1952) Notes on the cat flea in Puerto Rico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **2**, 337–342.
- Gamerschlag, S., Mehlhorn, H., Heukelbach, J., Feldmeier, H. & D'Haese, J. (2008) Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). *Parasitology Research*, **102**, 193–199.
- Gao, T., Shih, C., Rasnitsyn, A.P., Xu, X., Wang, S. & Ren, D. (2013) New transitional fleas from China highlighting diversity of early Cretaceous ectoparasitic insects. *Current Biology*, **23**, 1261–1266.
- Gasser, R.B., Nansen, P. & Guldberg, P. (1996) Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Molecular and Cellular Probes*, **10**, 99–105.
- Gil Collado, J. (1949) Pulgas españolas parásitas de roedores. *Revista Ibérica de Parasitología*, **9**, 214–258.
- Gil Collado, J. (1960) Insectos y ácaros de los animales domésticos. *Ediciones Salvat*, **20**, 305–325.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696–704.
- Haeselbarth, E. (1966) *The Arthropod Parasites of Vertebrates in Africa South of the Sahara (Ethiopian Region)*, Vol. 3. South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications of birds through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **270**, 313–321.
- Holland, G.P. (1949) The Siphonaptera of Canada. *Canada Department of Agriculture Technical Bulletin*, **70**, 1–306.
- Hopkins, G.H.E. & Rothschild, M. (1953) *An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History), Tungidae and Pulicidae*, Vol. 1. Trustees of the British Museum (Natural History), London.
- Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, **276**, 227–232.
- Hurst, G.D.D. & Jiggins, F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **272**, 1525–1534.
- Kaewmongkol, G., Kaewmongkol, S., McInnes, L.M. et al. (2011) Genetic characterization of flea derived *Bartonella* species from native animals in Australia suggest host-parasite co-evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 1868–1872.
- Kodandaramaiah, U., Simonsen, T.J., Bromilow, S., Wahlberg, N. & Sperling, F.A.H. (2013) Deceptive single-locus taxonomy and phylogeography: *Wolbachia* mediated discordance between morphology, mitochondria and nuclear markers in a butterfly species. *Ecology and Evolution*, **3**, 5167–5176.
- Kramer, F. & Mencke, N. (2001) *Flea Biology and Control*. Springer, Berlin.
- Lane, R.P. & Crosskey, R.W. (1993) *Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hall, Springer, London.
- Larkin, M.A., Blackshields, G. & Brown, N.P. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947–2948.
- Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, M. & Slapeta, J. (2014) High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology*, **28**, 330–336.
- Lawrence, A.L., Hii, S.F., Jirsová, D. et al. (2015) Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Veterinary Parasitology*, **210**, 215–223.
- Lewis, R.E. (1993) Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Journal of Medical Entomology*, **30**, 239–256.
- Lewis, R.E. & Lewis, J.H. (1985) Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. *Journal of Medical Entomology*, **22**, 134–152.
- Linardi, P.M. & Guimarães, L.R. (2000) *Sifonápteros do Brasil*. Museu de Zoologia USP/FAPESP, São Paulo.
- Linardi, P.M. & Santos, J.L.C. (2012) *Ctenocephalides felis felis* vs *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera:Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, **4**, 345–354.
- Luchetti, A., Trentini, M., Pampiglione, S., Fiorawanti, M.L. & Mantovani, B. (2007) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) and fleas across South America and Africa. *Parasitology Research*, **100**, 593–598.
- Marcilla, A., Bargaes, M.D., Abad-Franch, F. et al. (2002) Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution*, **1**, 225–235.
- Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research*, **112**, 2289–2298.
- Medvedev, S.G. (1994) Morphological basis of the classification of flea (Siphonaptera). *Entomological Review*, **73**, 30–51.
- Mehlhorn, H. (2001) *Encyclopaedic References of Parasitology*. Springer, Berlin.
- Ménier, K. & Beaucournu, J.C. (1998) Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. *Journal of Medical Entomology*, **35**, 883–890.
- Monje, L.D., Quiroga, M., Manzoli, D. et al. (2013) Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from *Philornis seguyi* (García, 1952) and *Philornis torquans* (Nielsen, 1913) (Diptera: Muscidae). *Systematic Parasitology*, **86**, 41–53.
- Monnerot, M., Solignac, M. & Wolstenholme, D.R. (1990) Discrepancy in divergence of the mitochondrial and nuclear genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*. *Journal of Molecular Evolution*, **30**, 500–508.

- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.
- Posada, D. & Buckley, T.R. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, **53**, 793–808.
- Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B. & Raoult, D. (2003) Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. claridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, **9**, 338–342.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.
- Rousset, F. & Solignac, M. (1995) Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6389–6393.
- Schulenburg, J.H., Hurst, G.D., Huigens, T.M., van Meer, M.M., Jiggins, F.M. & Majerus, M.E. (2000) Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* ftsZ and wsp gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 584–600.
- Shaw, K.L. (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 16122–16127.
- Shoemaker, D.D., Ahrens, M., Sheill, L., Mescher, M., Keller, L. & Ross, K.G. (2003) Distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology*, **32**, 1329–1336.
- Smith, G.P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, **191**, 528–535.
- Stothard, P. (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, **28**, 1102–1104.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731–2739.
- Vobis, M., D'Haese, J., Mehlhorn, H. *et al.* (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, **94**, 219–226.
- Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W. & Dittmar, K. (2008) A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*, **24**, 677–707.
- Zurita, A., Callejón, R., De Rojas, M., Gómez-López, M.S. & Cutillas, C. (2015) Molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny. *Bulletin of Entomological Research*, **105**, 704–711.

Accepted 19 January 2016

First published online 5 April 2016

Infection Rates of *Wolbachia* sp. and *Bartonella* sp. in Different Populations of Fleas

Antonio Zurita¹ · Sara García Gutiérrez¹ · Cristina Cutillas¹

Received: 26 January 2016 / Accepted: 13 July 2016 / Published online: 11 August 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract In the present study, a molecular detection of *Bartonella* sp. and *Wolbachia* sp. in *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) isolated from *Canis lupus familiaris* from different geographical areas of Spain, Iran and South Africa, and in *Stenoponia tripectinata tripectinata* isolated from *Mus musculus* from the Canary Islands has been carried out by amplification of the 16S ribosomal RNA partial gene of *Wolbachia* sp. and intergenic spacer region (its region) of *Bartonella* sp. A total of 70 % of *C. felis* analysed were infected by *W. pipientis*. This percentage of prevalence was considerably higher in female fleas than in male fleas. *Bartonella* DNA was not detected in *C. felis* from dogs, while *Bartonella elizabethae* was detected and identified in *S. t. tripectinata* from *M. musculus* from the Canary Islands representing 43.75 % prevalence. This report is the first to identify *B. elizabethae* in *S. t. tripectinata* collected in *M. musculus* from the Canary Islands. Thus, our results demonstrate that this flea is a potential vector of *B. elizabethae* and might play roles in human infection. The zoonotic character of this bartonellosis emphasizes the need to alert public health authorities and the veterinary community of the risk of infection.

Introduction

Flea-borne organisms are widely distributed throughout the world in endemic disease foci, where components of the enzootic cycle are present. However, flea-borne diseases could re-emerge in epidemic form because of changes in the vector–host ecology due to environmental and human behaviour modifications [3]. The incidences of flea-borne diseases and tick-borne diseases in the world are much greater than are generally recognized by physicians and health authorities. As a result, diagnosis and treatment are often delayed by health care professionals who are unaware of the presence of these infections and thus do not take them into consideration when attempting to determine the cause of a patient's illness. In the absence of major and dramatic outbreaks, health authorities often fail to allocate adequate funding to the surveillance and control of this group of diseases. It is important that those engaged in all aspects of public health surveillance are aware of the distribution and epidemiology of this group of diseases and are able to prepare for their control when necessary [3].

Fleas have a global distribution. According to the latest studies, we have evidence of at least 15 different species of fleas found on domestic dogs. *Ctenocephalides felis* occurs worldwide and is currently the most important flea pest of humans and many domestic animals. Its medical importance resides in the fact that it not only feeds on domestic and feral cats and dogs, but also parasitizes wild animals, humans and several livestock species [13]. For these reasons, since the cat flea has been recognized as the vector of several infectious agents that cause diseases in domestic animals and humans, the number of epidemiological studies based on *C. felis* has been increasing worldwide in the last years [1].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00284-016-1119-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Cristina Cutillas
cutillas@us.es

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Profesor García González 2, 41012 Seville, Spain

The genus *Bartonella* is the causative agent of a number of emerging and re-emerging infectious diseases in humans with potentially serious clinical implications (endocarditis, chronic bacteraemia, bacillary angiomatosis, Carrion's disease, etc.) [4]. *Bartonella* genus comprises over 30 species and subspecies. At least 13 known or suspected species are thought to contribute to blood-borne infections in humans [9]. High prevalence of DNA and genotype diversity has been detected in arthropod vectors around the world [20]. *Bartonella henselae* is a gram-negative facultative intracellular bacterium of veterinary and zoonotic importance distributed worldwide [7]. At present, its major competent vector is the cat flea, *C. felis* [8].

Domestic dogs can represent excellent epidemiological sentinels of *Bartonella* sp. infection in humans due to several factors such as close contact between domestic dogs and humans' leisure surroundings, the parasitism power of this vector, the high diversity of *Bartonella* species identified in canids and their accessibility for safe management and sample collection [11]. Different authors studied the presence of *Bartonella* species in *C. felis* parasitizing cats and dogs in Spain, Italy and France, *B. henselae* being the most prevalent species (20–30 %) [5, 25]. Furthermore, Klangthong et al. [20] studied the distribution and diversity of *Bartonella* species in rodents and their ectoparasites across Thailand. *B. elizabethae* was isolated for the first time in 1986 from the blood of a patient with severe endocarditis in Massachusetts. Subsequently, *B. elizabethae* or closely related isolates were detected in rats and other rodent species in Peru, the US, China, Bangladesh, Thailand and South Africa [6, 29].

Wolbachia strains are globally distributed, and currently these bacteria are considered the most abundant endosymbionts found in invertebrates. Several studies suggest that these bacteria are present in at least 65 % of arthropod species as well as in filarial nematodes and in some plant parasitic nematodes [33]. *Wolbachia* strains infecting arthropod and nematode hosts are represented by a single species, *Wolbachia pipientis* [22]. The widespread distribution of *Wolbachia* and their ability to manipulate the reproductive properties of arthropod hosts have attracted interest in its role in host biology, ecology and evolution, as well as in the development of novel symbiont-based and environment-friendly *Wolbachia*-based methods for the pest management of diseases such as dengue or filariasis [31, 32].

The aim of the present work is to verify the presence of *Bartonella* sp. and *Wolbachia* sp. in *C. felis* isolated from *Canis lupus familiaris* and *Stenoponia tripectinata tripectinata* from *Mus musculus* from different geographical areas in order to assess their prevalence in different populations of these fleas and their epidemiological importance. Furthermore, a phylogenetic study is carried out to assess the phylogenetic relationships between different strains and/or species.

Materials and Methods

Collection of Samples

Ctenocephalides felis specimens were collected from dogs (*C. l. familiaris*) from different geographical regions of Spain, South Africa and Iran (Table 1), whereas *S. t. tripectinata* specimens were collected from mice (*M. musculus*) from different islands which make up the Canary Islands (Gran Canaria, La Palma, El Hierro, La Gomera and Tenerife) (Spain) (Table 1). Single individuals were preserved in 70 % ethanol after field collection until required for subsequent identification and sequencing.

Morphological Identification

Fleas were examined under stereomicroscope and cleared with 10 % KOH [21] for morphological studies. Morphological identification of *C. felis* individuals was carried out according to the original descriptions reported by Marrugal et al. [26]. Specific identification of *S. t. tripectinata* was carried out based on molecular and morphological characteristics [2]. For details concerning host distribution on each island of the Canarian Archipelago and the distribution of *S. t. tripectinata* in different biotopes (Laurisilva, pine forest, etc.), see Zurita et al. [34].

Molecular Study

Fleas were individually frozen in liquid nitrogen and pulverized in a mortar. Genomic DNA was extracted using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and was detected after 0.8 % agarose gel electrophoresis using ethidium bromide.

A molecular detection of *Wolbachia* sp. was carried out in all the studied individual fleas using specific 16S rRNA gene primers (EHF16SD and EHR16SD) [30]. The PCR mix used was 5 μ l 5 \times PCR buffer, 2 μ l 10 mM dNTPs mixture (0.2 mM each), 4 μ l 25 mM MgCl₂, 5 μ l primer mix (1 mM each), 5 μ l template DNA, 0.5 μ l *goTaq* DNA polymerase (2.5 units) and autoclaved distilled water to 50 μ l. PCR conditions used were defined by Rolain et al. [30]. As positive control, DNA from *W. pipientis* [accession number (AN) LN864488] derived from *C. felis* from Spain was available, whereas for negative controls, we used DNA from *S. t. tripectinata* negative for *W. pipientis*.

Molecular detection of *Bartonella* sp. was tested in all the studied individual fleas according to PCR conditions and specific intergenic spacer region (its region) primers (URBarto1 and URBarto2) [30]. PCR mix and PCR conditions were those used for *Wolbachia* sp. 16S rRNA gene amplification. As positive control, DNA from *Bartonella* sp.

Table 1 Total of fleas classified as *Ctenocephalides felis* and *Stenoponia tripectinata tripectinata* isolated from *Canis lupus familiaris* and *Mus musculus*, respectively, from different geographical regions analysed in this study

Location	Host dog breed	Number of fleas		Species	<i>Wolbachia pipientis</i> positive	<i>Bartonella</i> sp. positive
		Male	Female			
Pilas, Sevilla/Spain	Pure	3	4	<i>C. felis</i>	1♂ 3♀	–
Villamanrique de la Condesa, Sevilla/Spain	Mixed	2	7	<i>C. felis</i>	2♂ 7♀	–
Lebrija, Sevilla/Spain	Pure	3	6	<i>C. felis</i>	0♂ 6♀	–
Dílar, Granada/Spain	Mixed	3	2	<i>C. felis</i>	0♂ 2♀	–
Fuentes de Andalucía, Sevilla/Spain	Pure	0	10	<i>C. felis</i>	0♂ 10♀	–
La Luisiana, Sevilla/Spain	Mixed	0	9	<i>C. felis</i>	0♂ 5♀	–
Dos Hermanas, Sevilla/Spain	Pure	3	7	<i>C. felis</i>	0♂ 6♀	–
Mairena, Sevilla/Spain	Pure	3	7	<i>C. felis</i>	0♂ 6♀	–
Mallorca/Spain	Pure	4	6	<i>C. felis</i>	3♂ 6♀	–
Sanlúcar de Barrameda, Cádiz/Spain	Mixed	5	7	<i>C. felis</i>	0♂ 6♀	–
Polokwane, Limpopo/South Africa	Mixed	2	8	<i>C. felis</i>	1♂ 8♀	–
Nashtarood, Mazandaran/Iran	Mixed	5	2	<i>C. felis</i>	0♂ 2♀	–
Total	–	33	75	–	7♂ 68♀	–

Location	Host	Number of fleas		Species	<i>Wolbachia pipientis</i> positive	<i>Bartonella</i> sp. positive
		Male	Female			
Gran Canaria, Canary Islands/Spain	<i>Mus musculus</i>	1♂	3♀	<i>S. t. tripectinata</i>	–	–
La Palma, Canary Islands/Spain	<i>Mus musculus</i>	1♂	2♀	<i>S. t. tripectinata</i>	–	1♂ 2♀
El Hierro, Canary Islands/Spain	<i>Mus musculus</i>	1♂	2♀	<i>S. t. tripectinata</i>	–	0♂ 1♀
La Gomera, Canary Islands/Spain	<i>Mus musculus</i>	2♂	1♀	<i>S. t. tripectinata</i>	–	–
Tenerife, Canary Islands/Spain	<i>Mus musculus</i>	2♂	1♀	<i>S. t. tripectinata</i>	–	2♂ 1♀
Total	–	7♂	9♀	–	–	3♂ 4♀

(AN LN847263) derived from *S. t. tripectinata* from Spain was available, whereas for negative controls, we used DNA from *C. felis* negative for *Bartonella* sp. Negative and positive controls were tested after every PCR reaction set.

The PCR products were checked on ethidium bromide-stained 2 % Tris–borate–EDTA agarose gels. Bands were eluted and purified from the agarose gel by using the QWizard SV gel and PCR clean-up system kit (Promega). Once purified, the products were sequenced by Stab Vida (Portugal). The alignment and sequence analyses were carried out as cited by Zurita et al. [34].

The 16S rRNA partial gene sequence of *Wolbachia* sp. and the intergenic spacer region (its region) sequence of *Bartonella* sp. were deposited in the GenBank database under the following ANs LN864488 and LN847263, respectively.

Results

A total of 108 (33 males and 75 females) individual *C. felis* fleas collected from 12 *C. l. familiaris* and 16 (7 males and 9 females) individual *S. t. tripectinata* from *M. musculus*

from different islands from the Canary Islands, Spain were examined for the presence of *Wolbachia* sp. and *Bartonella* sp. DNA (Table 1).

The presence of *Wolbachia* sp. was tested by amplification of the 16S rRNA gene in all fleas studied. In all positive fleas, a 334 base pairs fragment was detected. Seventy five sequences of the 16S rRNA gene fragment of *Wolbachia* sp. rRNA partial sequence amplified from *C. felis* were 100 % identical to each other and 98.8 % identical to *W. pipientis* rRNA partial sequence (GenBank AN AY026912; Table 2).

69.44 % [75 fleas: 68 (91 %) females and 7 (9 %) males, Fig. S1] of *C. felis* was PCR positive to *Wolbachia* spp. The percentage of *C. felis* fleas bearing *Wolbachia* sp. was higher than 50 % in dogs from different geographical localities excepting Dílar (Spain) and Nashtarood (Iran) (Table 1). A similar percentage of *Wolbachia* DNA was observed in all the dogs independently, irrespective of their breed (pure or mixture; Table 1).

The phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene fragment placed our sequence clustering (bootstrap value 82 %) with *W. pipientis* isolate (Diptera, Belgium, AN AY026912) and related with other isolates of *W. pipientis*

Table 2 Similarity percentage among *W. pipientis* isolated from different hosts and different geographical areas analysed in the present work

16S	<i>Wolbachia</i> sp. (<i>C. felis</i>) LN864488 (%)	<i>W. pipientis</i> (<i>Lycoriella solani</i> : Diptera) from Belgium AYO26912 (%)	<i>W. pipientis</i> (<i>Phlebotomus</i> sp.: Diptera) from Tunisia EU780684 (%)	<i>W. pipientis</i> (<i>Drosophila</i> sp.: Diptera) from France AY833061 (%)	<i>W. pipientis</i> (<i>Stomaphis</i> sp.: Hemiptera) from China KF751211 (%)	<i>W. pipientis</i> (<i>Ixodes ricinus</i> : Acari) from Slovakia GU724968
<i>Wolbachia</i> sp. (<i>C. felis</i>) LN864488	-					
<i>W. pipientis</i> (<i>Lycoriella solani</i> : Diptera) from Belgium AYO26912	98.8	-				
<i>W. pipientis</i> (<i>Phlebotomus</i> sp.: Diptera) from Tunisia EU780684	97.0	97.6	-			
<i>W. pipientis</i> (<i>Drosophila</i> sp.: Diptera) from France AY833061	98.2	99.4	97.6	-		
<i>W. pipientis</i> (<i>Stomaphis</i> sp.: Hemiptera) from China KF751211	97.0	97.6	97.6	97.6	-	
<i>W. pipientis</i> (<i>Ixodes ricinus</i> : Acari) from Slovakia GU724968	98.7	99.7	97.9	99.7	97.9	-

from *Drosophila*, *Ixodes* and different species of fleas (Fig. 1). *Wolbachia pipientis* was not detected in any flea classified as *S. t. tripectinata*.

Bartonella DNA was not detected in *C. felis* from dogs using its region primers, while *Bartonella* sp. was detected in seven individuals of *S. t. tripectinata* from El Hierro, La Palma and Tenerife (Canary Islands; Table 1). These data represent a 43.75 % prevalence of *Bartonella* sp. in *S. t. tripectinata*. The sequences of the gene fragment of *Bartonella* from *M. musculus* were 100 % identical to each other and were 684 base pairs in length. Furthermore, this sequence was 100 % identical to *Bartonella* sp. from Portugal and Spain (ANs AY877424 and EU218552, respectively; Table 3) and 99.6 % homologous with *B. elizabethae* from Georgia (JF766264 and JF766266; Table 3).

The phylogenetic analysis based on the its region sequences of different isolates of *Bartonella* revealed the presence of one clade clustering our sequences of *Bartonella* from *S. t. tripectinata* with those from *S. t. tripectinata* from Portugal, those from *Mus spretus* from Seville and *B. elizabethae* from Georgia (US; Fig. 2).

Discussion

In the present work, we detected, for the first time, the presence of *W. pipientis* in the cat flea *C. felis* isolated from *C. l. familiaris* from the south of Spain, the Balearic Archipelago (Spain), South Africa and Iran and *Bartonella* sp. from *S. t. tripectinata* isolated from *M. musculus* from the Canary Islands.

Our results strongly support the role of *W. pipientis* as a common endosymbiont of *C. felis*. These results are in agreement with several studies that have shown high prevalence of this bacterium in Order Siphonaptera [17, 28]. Furthermore, our analysis is in agreement with Lo et al. [22] who suggested that *W. pipientis* is the only *Wolbachia* species infesting arthropods.

In the present study, the overall incidence of *W. pipientis* among *C. felis* from different geographical regions (69.4 %) was similar to that reported by Hilgenboecker et al. [18] who estimated that over 65 % of insect species carry *Wolbachia*. Nevertheless, these data are in contrast to Gorham et al. [15] or Heukelbach et al. [17] who found a prevalence of *Wolbachia* spp. in different flea species that ranged from 7 to 100 %. This large variation may be due to sampling bias because flea samples were collected from limited numbers of individual hosts and all the fleas could belong to a few closely related colonies. Furthermore, this result may also indicate that the host species is an important determinant of the prevalence of *Wolbachia* sp. in fleas [15].

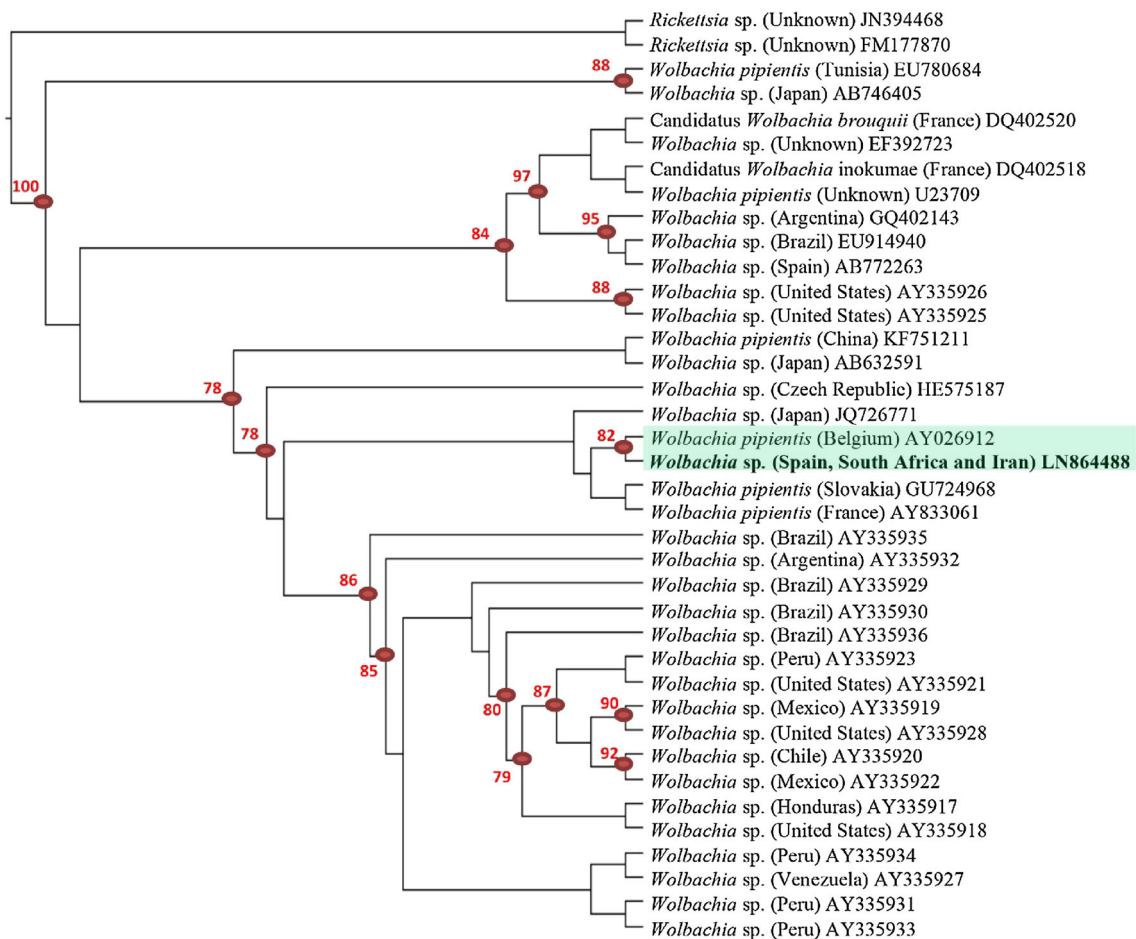


Fig. 1 Phylogenetic tree of *Wolbachia* sp. from different geographical origins (see Appendix) based on 16S ribosomal RNA partial gene inferred using the maximum likelihood method. Bootstrap values above 70 % are indicated at relevant nodes

On the other hand, the number of female fleas collected was greater than the number of males (75–33, respectively); this outcome is expected in temporary parasites, where the males often have shorter life spans and are more active, resulting in greater separation from hosts than in the case of females [27]. This fact could also be the reason for the high prevalence of *W. pipientis* noticed in this study. By a process called “feminization”, some *Wolbachia* strains are able to convert a genetic male individual into a functional female individual. Because of this, the infected females produce up to 90 % of female individuals in their descendants. As a result of this, the relative frequency of infected females will increase through generations.

In all geographical areas studied, the number of *C. felis* bearing *W. pipientis* was higher than those individuals not infected with this bacterium excepting Nashtarood (Iran) and Dılar (Spain). This could be explained by the higher number of male fleas analysed in respect of females. Thus, our results are in agreement with Luchetti et al. [23] who found a higher prevalence of *W. pipientis* in females of *Tunga trimamillata* than in males of this species. The

prevalence data based on dog breeds and dog lifestyles (domestic or from kennels) were similar. Thus, we can suggest that dog breeds and lifestyles would not be determinants in the prevalence of *W. pipientis* in *C. felis*.

Finally, the absence of *Bartonella* sp. in *C. felis* individuals from different geographical regions is in agreement with Gracia et al. [16] who found 5.3 and 0 % prevalences (1/19 and 0/9) of *Bartonella* sp. in cat fleas from Andalusia and the Balearic Islands, respectively, but is not in agreement with other authors who found *Bartonella* species infesting cat fleas isolated from dogs and cats from Spain [5, 25].

According to Segoli et al. [31] or Slatko et al. [32], who cited the role of *Wolbachia* sp. as a target for the intervention of insect pathogens transmission, we suggest a possible antagonistic effect among *W. pipientis* and other bacteria genera such as *Bartonella* sp., which could decrease cases of co-infection between both bacteria in fleas. In spite of this, to assume this fact, more exhaustive studies are needed in this field, especially in Europe where epidemiological knowledge about the role of *W. pipientis*

Table 3 Similarity percentage observed among *Bartonella* species analysed in this work based on the intergenic spacer region (its region)

Its regions	<i>Bartonella</i> sp. (Canary Islands) LN847263 (%)	<i>Bartonella</i> sp. (Portugal) AY877424 (%)	<i>B. elizabethae</i> (Georgia, US) JF766264 (%)	<i>B. elizabethae</i> (Georgia, US) JF766266 (%)	<i>Bartonella</i> sp. (Sevilla, Spain) EU218552 (%)	<i>Bartonella</i> sp. (Georgia, US) JN403036 (%)	<i>B. elizabethae</i> (unknown) L35103 (%)	<i>B. tribocorum</i> (US) DQ480757
<i>Bartonella</i> sp. (Canary Islands) LN847263	–							
<i>Bartonella</i> sp. (Portugal) AY877424	100	–						
<i>B. elizabethae</i> (Georgia, US) JF766264	99.6	99.6	–					
<i>B. elizabethae</i> (Georgia, US) JF766266	99.6	99.6	99.7	–				
<i>Bartonella</i> sp. (Sevilla, Spain) EU218552	100	100	99.6	99.6	–			
<i>Bartonella</i> sp. (Georgia, US) JN403036	99.4	99.4	99.8	99.6	99.4	–		
<i>B. elizabethae</i> (unknown) L35103	99.4	99.4	99.7	99.8	99.4	99.7	–	
<i>B. tribocorum</i> (US) DQ480757	89.9	89.9	88.3	88.4	89.9	89.9	88.6	–

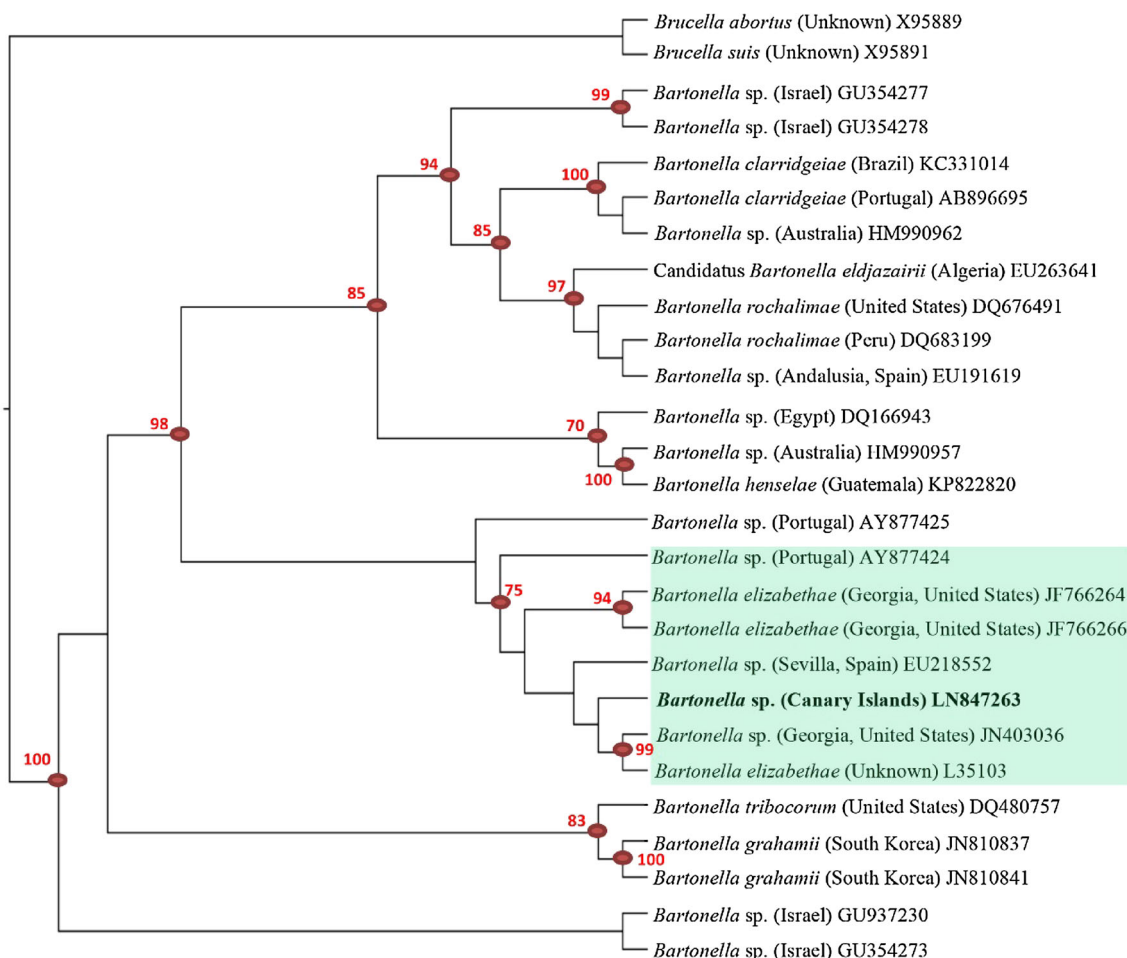


Fig. 2 Phylogenetic tree of *Bartonella* sp. from different geographical origins (see Appendix) based on intergenic spacer region (its region) inferred using the maximum likelihood method. Bootstrap values above 70 % are indicated at relevant nodes

in fleas is scarce. According to Dittmar and Whiting [12], the discovery of symbiotic bacteria in wild populations of Siphonaptera suggests a potentially widespread association with fleas, and thus, the presence of *W. pipientis* in fleas raises many more questions. For example, the effects of the bacteria upon the hosts, the full extent of infection throughout the order Siphonaptera and the practical implications of such infections must all be investigated further.

Bartonella henselae is the most prevalent species found in *C. felis* from cats and dogs worldwide [25].

The species found in rodents include *B. elizabethae*, *B. coopersplainsensis*, *B. phoceensis*, *B. queenslandensis*, *B. rattimassiliensis*, *B. tribocorum* and three genotypes presumably representing new *Bartonella* species [19]. De Sousa et al. [10] demonstrated that two rodent flea species (*S. tripectinata* and *Ornitophaga* spp.) are potential vectors of *B. elizabethae*, and might play roles in human infection.

Data on the role of small mammals as *Bartonella* reservoir hosts are scarce in Spain [14]. In Andalusia

(southern Spain), *B. tribocorum* was detected in 20 % of the analysed Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) and two different *Bartonella* genotypes close to *B. elizabethae* were found in 29 % of the Algerian mice (*M. spretus*) that were studied [24]. Environmental studies are essential for identifying which *Bartonella* species are circulating in a specific area and for evaluating their risk for humans. Thus, Gil et al. [14] studied the variability of *Bartonella* genotypes among small mammals in three different regions of Spain: The Basque Country, Catalonia and Madrid. However, no data are available about the presence of *Bartonella* sp. in small mammal species from the Canary Islands.

In the present work, *Bartonella* DNA was not detected in *C. felis* from dogs using its region primers, while *Bartonella* sp. was detected in seven individuals of *S. t. tripectinata* in *M. musculus* from El Hierro, La Palma and Tenerife (Canary Islands) representing a 43.75 % prevalence of *Bartonella* sp. in *S. t. tripectinata*. This prevalence rate is higher than that observed by De Sousa et al. [10] who found that 37 % of *S. tripectinata* collected in *M.*

spretus was infected with *Bartonella* sp. Furthermore, our sequences were 100 % identical to those cited by De Sousa et al. [10] in Portugal and by Márquez et al. [24] in Spain and 99.6 % homologous with *B. elizabethae*. Since different isolates of *B. elizabethae* are 99.6–99.8 % homologous (see Table 3), we consider that our isolate from *S. t. tripectinata* is *B. elizabethae*. Gil et al. [14] found two genotypes closely related to *B. elizabethae* which presented a high similarity with *Bartonella* identified in rodent fleas from Portugal [10] and *M. spretus* in Andalusia, southern Spain [24], and therefore with our isolates from rodent fleas from the Canary Islands, indicating that these genotypes are well distributed in the Iberian Peninsula and Canary Islands. These authors suggest that this is probably due to a more efficient cycle of transmission in southern Spain than in the rest of the country, although more studies are needed to confirm this point. Klangthong et al. [20] found that the distribution of *Bartonella* species among rodents supports a host-specific pattern. This fact justified a 100 % identity of our isolate (*B. elizabethae*) and those from Portugal and Andalusia, since all three were collected from *Mus* species.

The detection of these pathogenic bacteria in their vector arthropods can be used in epidemiologic studies and control strategies.

This report is the first to identify *B. elizabethae* in *S. t. tripectinata* collected in *M. musculus* from the Canary Islands. Thus, our results demonstrate that this flea is a potential vector of *B. elizabethae* and might play roles in human infection in the Canary Islands. The zoonotic character of this bartonellosis emphasizes the need to alert public health authorities and the veterinary community of the risk of infection.

Acknowledgments The present work was supported by a Grant of the V Plan Propio de Investigación of the University of Sevilla, Spain. We wish to thank Dr. Ali Halajian for his assistance in the course of the field work, the Biodiversity Research Chair (University of Limpopo: Professor Wilmien J. Luus-Powell) for funding the field works in South Africa, Firouz-Farideh for partly funding field works in Iran, and Pietersburg Veterinary Clinic (Polokwane, South Africa) for helping with some of the samples. We thank Mrs. Anne Kendall for the critical reading of the manuscript.

Appendix

See Table 4.

Table 4 List of taxa used in the analysis, including GenBank accession numbers, isolation source and geographical origin information

Species	Geographical origin	Isolation sources	Accession numbers	Gen regions
<i>Brucella abortus</i>	Unknown	Unknown	X95889	Its gene
<i>Brucella suis</i>	Unknown	Unknown	X95891	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Flea isolated from <i>Meriones tristami</i>	GU354277	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Flea isolated from <i>Meriones tristami</i>	GU354278	Its gene
<i>Bartonella clarridgeiae</i>	Brazil	Cat blood	KC331014	Its gene
<i>Bartonella clarridgeiae</i>	Portugal	Cat blood	AB896695	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Australia	Flea isolated from <i>Vulpes vulpes</i> (red fox)	HM990962	Its gene
Candidatus <i>Bartonella eldjazairii</i>	Algeria	Flea isolated from rodent	EU263641	Its gene
<i>Bartonella rochalimae</i>	US	Dog blood	DQ676491	Its gene
<i>Bartonella rochalimae</i>	Peru	Human blood	DQ683199	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Andalusia (Spain)	<i>Pulex irritans</i> isolated from <i>Vulpes vulpes</i> (red fox)	EU191619	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Egypt	<i>Xenopsylla cheopis</i>	DQ166943	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Australia	<i>Ctenocephalides felis</i> isolated from <i>Vulpes vulpes</i> (red fox)	HM990957	Its gene
<i>Bartonella henselae</i>	Guatemala	Cat blood	KP822820	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Portugal	<i>Ornitophaga</i> sp. isolated from <i>Mus spretus</i>	AY877425	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Portugal	<i>Stenoponia tripectinata</i> isolated from <i>Mus spretus</i>	AY877424	Its gene
<i>Bartonella elizabethae</i>	Georgia, US	Heart tissue obtained from <i>Meriones lybicus</i>	JF766264	Its gene
<i>Bartonella elizabethae</i>	Georgia, US	Heart tissue obtained from <i>Apodemus sylvaticus</i>	JF766266	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Sevilla, Spain	Mouse spleen obtained from <i>Mus spretus</i>	EU218552	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Georgia, US	Heart tissue obtained from <i>Apodemus sylvaticus</i>	JN403036	Its gene

Table 4 continued

Species	Geographical origin	Isolation sources	Accession numbers	Gen regions
<i>Bartonella elizabethae</i>	Unknown	Unknown	L35103	Its gene
<i>Bartonella tribocorum</i>	US	<i>Xenopsylla cheopis</i>	DQ480757	Its gene
<i>Bartonella grahamii</i>	South Korea	Spleen tissue obtained from <i>Apodemus agrarius</i>	JN810837	Its gene
<i>Bartonella grahamii</i>	South Korea	Spleen tissue obtained from <i>Apodemus agrarius</i>	JN810841	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Flea isolated from muridae rodent	GU937230	Its gene
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Flea isolated from muridae rodent	GU354273	Its gene
<i>Rickettsia</i> sp.	Unknown	<i>Otirohynchus sulcatus</i>	JN394468	16S
<i>Rickettsia</i> sp.	Unknown	<i>Deronectes platynotus</i>	FM177870	16S
<i>Wolbachia pipientis</i>	Tunisia	<i>Phlebotomus</i> sp.	EU780684	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Japan	<i>Curculio</i> sp.	AB746405	16S
Candidatus <i>Wolbachia brouquii</i>	France	<i>Sergentomyia</i> sp.	DQ402520	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Unknown	<i>Exorista sorbillans</i>	EF392723	16S
Candidatus <i>Wolbachia inokumae</i>	France	<i>Phlebotomus</i> sp.	DQ402518	16S
<i>Wolbachia pipientis</i>	Unknown	<i>Culex pipiens</i>	U23709	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Argentina	<i>Naupactus cervinus</i>	GQ402143	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Brazil	<i>Diaphorina citri</i>	EU914940	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Spain	<i>Phlaenus maghresignus</i>	AB772263	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	US	<i>Pulex irritans</i> isolated from <i>Cynomys</i> sp.	AY335926	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	US	<i>Oropsylla hirsuta</i> isolated from <i>Cynomys</i> sp.	AY335925	16S
<i>Wolbachia pipientis</i>	China	<i>Stomaphis</i> sp.	KF751211	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Japan	<i>Penicillidia jenynsii</i>	AB632591	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Czech Republic	<i>Ogcodes fumatus</i>	HE575187	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Japan	<i>Kleidocerys resedae</i>	JQ726771	16S
<i>Wolbachia pipientis</i>	Belgium	<i>Lycoriella</i> sp.	AY026912	16S
<i>Wolbachia pipientis</i>	Slovakia	<i>Drosophila</i> sp.	GU724968	16S
<i>Wolbachia pipientis</i>	France	<i>Ixodes ricinus</i>	AY833061	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Brazil	<i>Xenopsylla cheopis</i> isolated from <i>Rattus</i> sp.	AY335935	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Argentina	<i>Phtiropsylla agenoris</i> isolated from <i>Zaedyus pichyi</i>	AY335932	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Brazil	<i>Adoratopsylla intermedia</i> isolated from <i>Metachirus</i> sp.	AY335929	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Brazil	<i>Polygenis pradoi</i> isolated from <i>Akodon</i> sp.	AY335930	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Brazil	<i>Xenopsylla cheopis</i> isolated from <i>Rattus</i> sp.	AY335936	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Peru	<i>Ctenocephalides felis</i> isolated from <i>Canis lupus familiaris</i>	AY335923	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	US	<i>Geusibia ashcrafti</i> isolated from <i>Ochotona</i> sp.	AY335921	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Mexico	<i>Echidnophaga gallinacea</i> isolated from <i>Urocyon</i> sp.	AY335919	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	US	<i>Peromyscopsylla selensis</i> isolated from <i>Peromyscus</i> sp.	AY335928	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Chile	<i>Sphinctopsylla ares</i> isolated from <i>Oryzomys</i> sp.	AY335920	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Mexico	<i>Jellisonia</i> sp. isolated from <i>Oryzomys</i> sp.	AY335922	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Honduras	<i>Jellisonia</i> sp. isolated from muridae	AY335917	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	US	<i>Myodopsylla gentilis</i> isolated from <i>Myotis</i> sp.	AY335918	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Peru	<i>Pulex simulans</i> isolated from <i>Cavia aperea</i>	AY335934	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Venezuela	<i>Craneopsylla minerva</i> isolated from <i>Rhipidomys</i> sp.	AY335927	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Peru	<i>Ectinorus</i> sp. isolated from <i>Lagidium</i> sp.	AY335931	16S
<i>Wolbachia</i> sp.	Peru	<i>Plocopsylla achillea</i> isolated from <i>Akodon</i> sp.	AY335933	16S

References

- Assarasakorn S, Veir JK, Hawley JR, Brewer MM, Morris AK, Hill AE, Lappin MR (2012) Prevalence of *Bartonella* species, hemoplasmas, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand. *Res Vet Sci* 93:1213–1216
- Beaucournu JC, Launay H (1990) Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental. In: Faune de France, vol 76. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris
- Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D (2010) Fleas and flea-borne diseases. *Int J Infect Dis* 14:667–676
- Blanco JR, Raoult D (2005) Diseases produced by *Bartonella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23:313–319
- Blanco JR, Pérez-Martínez L, Vallejo M, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA (2006) Prevalence of *Rickettsia felis*-like and *Bartonella* spp. In *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from La Rioja (northern Spain). *Ann Acad Sci NY* 1078:270–274
- Castle KT, Kosoy M, Lerthusnee K, Phelan L, Bai Y, Gage KL, Leepitakrat W, Monkanna T, Khilaimanee N, Chandranon K, Jones JW, Coleman RE (2004) Prevalence and diversity of *Bartonella* in rodents of northern Thailand: a comparison with *Bartonella* in rodents from southern China. *Am J Trop Med Hyg* 70:429–433
- Chomel BB, Kasten RW (2010) Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol* 109:743–750
- Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN (1996) Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 34:1952–1956
- Chomel BB, Kasten RW, Williams C, Wey AC, Henn JB, Maggi R, Carrasco S, Mazet J (2009) *Bartonella* endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and patients. *Ann NY Acad Sci* 1166:120–126
- De Sousa R, Edouard-Fournier P, Santos-Silva M, Amaro F, Bacellar F, Raoult D (2006) Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae*. *Am J Trop Med Hyg* 75:727–731
- Diniz PPVP, Schwartz DS, de Moraes HS, Breitschwerdt EB (2007) Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:689–698
- Dittmar K, Whiting MF (2004) New *Wolbachia* endosymbionts from nearctic and neotropical fleas (Siphonaptera). *J Parasitol* 90:953–957
- Durden LA, Traub R (2002) Medical and veterinary entomology, vol 7. Academic, San Diego, pp 103–125
- 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, García-Pérez AL, Anda P (2010) Variability of *Bartonella* genotypes among small mammals in Spain. *Appl Environ Microbiol* 76:8062–8070
- Gorham CH, Fang QQ, Durden LA (2003) *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *J Parasitol* 89:283–289
- Gracia MJ, Marcén JM, Pinal R, Calvete C, Rodes D (2015) Prevalence of *Rickettsia* and *Bartonella* species in Spanish cats and their fleas. *J Vector Ecol* 49:233–239
- Heukelbach J, Bonow I, Witt L, Feldmeier H, Fischer P (2004) High infection rate of *Wolbachia* endobacteria in the sand flea *Tunga penetrans* from Brazil. *Acta Trop* 92:225–230
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281:215–220
- Jiyipong T, Jittapalapong S, Morand S, Raoult D, Rolain JM (2012) Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* spp. in small mammals from Southeastern Asia. *Appl Environ Microbiol* 78:8463–8466
- Klangthong K, Promstaporn S, Leepitakrat S, Schuster AL, McCardle PW, Kosoy M, Takhampunya R (2015) The distribution and diversity of *Bartonella* species in rodents and their ectoparasites across Thailand. *PLoS One* 10:e0140856
- Lewis RE (1993) Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *J Med Entomol* 30:239–256
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill SL, Werren JH, Bordenstein SR, Bandi C (2007) Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:654–657
- Luchetti A, Mantovani B, Fioravanti ML, Trentini M (2004) *Wolbachia* infection in the newly described Ecuadorian sand flea, *Tunga trimamillata*. *Exp Parasitol* 108:18–23
- Márquez FJ, Rodríguez-Liébana JJ, Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, Hidalgo-Fontiveros A, Bernabeu-Wittel M, Muniain MA, Pachón J (2008) Variability of *Bartonella* genotypes among small mammals in Spain. *Appl Environ Microbiol* 8:695–700
- Márquez FJ, Muniain MA, Rodríguez-Liebana JJ, Del Toro MD, Bernabeu-Wittel M, Pachón AJ (2009) Incidence and distribution pattern of *Rickettsia felis* in peridomestic fleas from Andalusia, southeast Spain. *Ann Acad Sci NY* 1078:344–346
- Marrugal A, Cutillas C, Callejón R, De Rojas M, Halajian A (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitol Res* 112:2289–2298
- Marshall AG (1981) The ecology of ectoparasitic insects. Academic, New York
- Oteo JA, Portillo A, Portero F, Zavala-Castro J, Venzal JM, Labruna MB (2014) 'Candidatus *Rickettsia asemboensis*' and *Wolbachia* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador. *Parasites Vectors* 30:455
- Pretorius AM, Beati L, Birtles RJ (2004) Diversity of bartonellae associated with small mammals inhabiting Free State Province, South Africa. *Int J Evol Biol* 54:1959–1967
- Rolain J, Franc M, Davoust B, Raoult D (2003) Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis* 9:338–342
- Segoli M, Hoffman A, Lloyd J, Omodei G, Ritchie S (2014) The effect of virus-blocking *Wolbachia* on male competitiveness of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 8:3294
- Slatko BE, Luck AN, Dobson SL, Foster JM (2014) *Wolbachia* endosymbionts and human disease control. *Mol Biochem Parasitol* 195:88–95
- Werren JH, Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc Biol Sci* 267:1277–1285
- Zurita A, Callejón R, De Rojas M, Gómez-López MS, Cutillas C (2015) Molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny. *Bull Entomol Res* 105:704–711

Morphological and molecular study of the genus *Nosopsyllus* (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *Nosopsyllus barbarus* (Jordan & Rothschild 1912) as a junior synonym of *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc d'Antic, 1800)

Antonio Zurita, Rocío Callejón, Manuel de Rojas and Cristina Cutillas*

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy,
University of Sevilla, Prof. García González 2, 41012 Sevilla, Spain

*Corresponding author, e-mail: cutillas@us.es

Version of Record, published online 26 July 2017; published in print 1 December 2017

Abstract

In the present work, a comparative morphological and molecular study of *Nosopsyllus barbarus* (Jordan & Rothschild 1912) and *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc, d'Antic 1800) isolated from rodents from different geographical regions (Spain, Morocco, Belgium, France and Portugal) has been carried out. The Internal Transcribed Spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2) and partial 18S rRNA, and partial cytochrome *c* oxidase 1 (*cox1*) and cytochrome *b* (*cytb*) mtDNA sequences were determined to clarify the taxonomic status of these two species and to assess intraspecific variation and inter-specific sequence differences. In addition, a phylogenetic analysis with other species of fleas using Bayesian inference was performed. We have found morphological differences between *N. barbarus* and *N. fasciatus* that did not correspond with molecular differences. Furthermore, any of the five molecular markers used in this study was able to discriminate between the two species. Thus, based on the phylogenetic and molecular study of three nuclear markers (18S, ITS1, ITS2) and two mitochondrial markers (*cox1* and *cytb*), as well as the concatenated dataset of both species, we concluded that morphological characters traditionally used to discriminate between the two species do not provide solid arguments for considering these two “morphospecies” as two different species. Therefore, we propose *N. barbarus* should be considered as a junior synonym of *N. fasciatus*.

Keywords

Nosopsyllus barbarus; *Nosopsyllus fasciatus*; ribosomal RNA; mitochondrial DNA; Siphonaptera

Introduction

The genus *Nosopsyllus* (Siphonaptera: Ceratophyllidae) is a large genus containing 68 recognized taxa divided into four subgenera (*Nosopsyllus*, *Gerbillophilus*, *Nosinius*,

and *Penicus*). Except for one species from sub-Saharan Africa, the genus is native to the Palearctic Region, although two species show a cosmopolitan distribution due to human transportation (Lewis 1990). Their hosts are rodents, mostly murids and gerbils, but occasionally, they parasitize other rodents or even domestic mammals. Because of this, fleas of this genus can bite humans and are able to transmit several zoonotic pathogens, such as the agents of plague or murine typhus (Durden & Traub 2002).

For decades, the specific differentiation of fleas has been based on morphological criteria (the shape and structure of their complex genitalia, distribution of setae, spines and ctenidia, etc). According to these criteria, different species of *Nosopsyllus* have been reported parasitizing different hosts from different geographical origins (Lewis 1967; Beaucournu & Launay 1990; Marquez & Salas 1990; Giannetto et al. 1997). However, there is no evidence of molecular taxonomic studies of this genus.

Within this genus, *N. fasciatus* (Bosc d'Antic 1800) has been the most studied species. The cosmopolitan distribution together with its predilection for synanthropic rodents and its association with disease transmission have been widely cited in several studies (Gil Collado 1949; Lewis 1967; Lewis 1990; Beaucournu & Launay 1990; Marquez & Salas 1990; Lewis 1993; Durden & Traub 2002). *N. fasciatus* is considered the most common flea parasitizing rodents in several Palearctic regions (Lewis 1967; Lewis 1990; Beaucournu & Launay 1990; Giannetto et al. 1997). However, other species of this genus, such as *N. barbarus* (Jordan & Rothschild 1912) have been cited to coexist with *N. fasciatus* in some of these geographical regions such as Mediterranean islands or southeast regions of Spain (Lewis 1967; Beaucournu & Alcover 1984; Beaucournu & Launay 1990; Marquez & Salas 1990; Giannetto et al. 1997).

N. barbarus has been classically reported in the north of Africa, especially in Morocco and Tunisia (Beaucournu & Launay 1990). In the last twenty years, it also has been recorded from some Mediterranean islands, such as the Balearic Archipelago and the Canary Islands (Beaucournu & Alcover 1984; Beaucournu & Launay 1990), from Sardinia, Egadi, and Sicily (Giannetto et al. 1997) and from the southeast Spain (Marquez & Salas 1990).

The original description of *N. barbarus* (Jordan & Rothschild 1912) suggested that it is probably close to *N. fasciatus* and that both were originally geographical varieties of one species (Lewis 1967). The similarity of male specimens of *N. barbarus* to those of *N. fasciatus* makes the species diagnosis very difficult, especially when there are few females (which can be easily differentiated), and when the specimens come from areas where the two species coexist (Beaucournu & Launay 1990; Giannetto et al. 1997).

The molecular methods have shown that not all flea species previously described only by morphological methods have always remained as defined species. Furthermore, according to Whiting et al. (2008) it is known that the major obstacle in flea phylogenetics has been their extreme morphological specializations associated with ectoparasitism, and the inability of systematists to homologize characters adequately across fleas and outgroup taxa. Thus, for example, Marrugal et al. (2013) found that *Ctenocephalides felis*, collected from dogs from different geographical locations, included four populations with different morphological characteristics, which did not correspond with molecular differences.

In most eukaryotes, ribosomal RNA (rRNA) genes are located in a multigene family of genomic clusters of repeated sequences (Drouin & de Sá 1995). Within these clusters, internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and an intergenic spacer (Gerbi 1986) separate the 18S, 5.8S, and 28S rRNA genes. Ribosomal DNA (rDNA) is a reliable and informative phylogenetic marker that contains sequences with different rates of evolutionary variability (Zagoskin et al. 2014). Therefore, comparison of rRNA sequences allows the estimation of the evolutionary distances at intergeneric and higher taxonomic levels.

In the last fifteen years, ITS1 and ITS2 have been widely used for analyzing genetic relationships at families, genus and species level in arthropods (De Rojas et al. 2002, 2007; Yong et al. 2014; Marangi et al. 2014; Monje et al. 2013), including fleas (Vobis et al. 2004; McKern et al. 2008; Gamerschlag et al. 2008). Recently, Marrugal et al. (2013), Zurita et al. (2015), and Zurita et al. (2016) found that the analyses of both rDNA markers in flea specimens are helpful for approaching different taxonomic issues at a species level; however, these authors noticed that the assessment of ITS1 and ITS2 sequences is not useful for discriminating different populations within one species of the genus. In addition to ITS1 and ITS2, Whiting et al. (2008) and Acosta & Morrone (2013) used 18S ribosomal RNA marker in order to clarify molecular relationships between families and subfamilies in arthropods including fleas.

On the other hand, comparison of more evolutionarily variable protein-coding genes such as cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) and cytochrome b (*cytb*) mitochondrial DNA (mtDNA) enables the study of phylogenetic relationships at the species and population level in arthropods (de la Rua et al. 2011; Erster et al. 2013; Lopez-Osorio et al. 2014). For most animals, the *cox1* mtDNA has become the standard barcode region (Navajas & Navia 2010). The reasons for using mtDNA as a marker of choice are well known. Experimentally, mtDNA is easy to amplify and mitochondrial gene content is strongly conserved, with very few duplications, no introns, and very short intergenic regions (Gissi et al. 2008). Furthermore, its inheritance is clonal (maternal), which means that the whole genome behaves as one and all sites share a common genealogy (Galtier et al. 2009). Thus, several taxonomic and phylogenetic studies about fleas based on mitochondrial DNA markers, such as *cox1* and *cytb* mtDNA, have been published in recent years (Kaewmongkol et al. 2011; Lawrence et al. 2014; Zurita et al. 2015; Zhu et al. 2015; Zurita et al. 2016).

In the present work, we carried out a morphological and molecular study of *N. barbarus* and *N. fasciatus* isolated from different hosts and different geographical origins. Thus, the ITS1, ITS2, partial 18S rRNA gene and partial *cox1* and *cytb* mtDNA genes have been sequenced in order to assess intra-population, intraspecific and inter-specific variations, which enable us to clarify the taxonomic status of these species.

Materials and methods

Collection of samples

Rodents belonging to Muridae and Soricidae from different geographical localities in Morocco, Portugal, France, Belgium, and Spain were captured from urban and rural

areas using live traps. Afterward, rodents were exhaustively examined for fleas through an inspection of head, neck, body, sides, tail, and ventral regions of each animal. Some fleas were obtained through our own collecting efforts whereas others were obtained through the assistance of colleagues (see Acknowledgements) (Table S1). The collected fleas were kept in Eppendorf tubes with 70 % ethanol until required for subsequent identification and sequencing.

Morphological identification

Flea specimens that we collected were identified by us whereas those fleas provided by our colleagues were first identified by them (see Acknowledgements) and then morphologically compared with our specimens in our laboratory (Table S1). Fleas isolated for morphological studies were cleared with 10% KOH or NaOH (Lewis 1993), examined under a stereomicroscope, and then mounted and photographed for morphological studies. Genera and specific identification was carried out according to Jordan & Rothschild (1912), Lewis (1967), Hastriter & Tipton (1975), Beaucournu & Launay (1990), Lewis (1993), Giannetto et al. (1997), and Acosta & Morrone (2003). Thus, all morphological characteristics cited by different authors have been considered for the specific determination of the genus *Nosopsyllus* and the species *N. barbarus* and *N. fasciatus*.

Molecular study

For molecular analysis, fleas kept in 70 % ethanol were morphologically identified first, and then specific specimens were frozen in liquid nitrogen and pulverized in a mortar. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and was checked using an electrophoresis in a 0.8 % agarose gel infused with ethidium bromide.

All molecular markers sequenced in this study were amplified using a polymerase chain reaction (PCR) using a thermal cycler (Eppendorf AG). PCR mix, PCR conditions and PCR primers are summarized in Table S2. The ITS1, ITS2, partial 18S rRNA gene, partial *cox1* and *cytb* gene sequences obtained from *N. barbarus* and *N. fasciatus* were deposited in GenBank (Table 1).

The PCR products were checked on ethidium bromide stained 2 % Tris–Borate–EDTA (TBE) agarose gels. Bands were eluted and purified from the agarose gel by using the QWizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega). Once purified, the products were sequenced by Stab Vida (Portugal). All phylogenetic analyses were performed on the rDNA and mtDNA datasets. To obtain a nucleotide sequence alignment file, we used MUSCLE alignment method (Edgar, 2004) by the MEGA program version 5.2 (Tamura et al. 2011). The rDNA intra-individual variation was determined by sequencing 10 clones of one individual. The PCR products were eluted from the agarose gel by using the WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and transformation was carried out as cited by Cutillas et al. (2009). Plasmids were purified using a Wizard Plus SV (Promega) and sequenced by Stab Vida (Portugal) with a universal primer (M13).

Table 1. GenBank accession numbers of ITS1, ITS2 and *cytb*, *cox1* and partial 18S gene sequences of individuals of *Nosopsyllus fasciatus*, *Nosopsyllus barbarus* and *Panorpa meridionalis* isolated from different hosts from different geographical localities obtained in this work.

Location/Country	Species	Host	Number of fleas	Base pairs (bp)	Accession number
ITS1					
Dos Hermanas/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	2	1,100	LN881538
Granada/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	3	1,100	LN881539
Granada/Spain (clone 1 and 2)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	1,100	LN881543
Granada/Spain (clone 3)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	1,100	LN881544
El Hierro/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Mus</i> sp.	3	1,100	LN881540
Chertal/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	3	1,100	LT158054-55
Chertal/Belgium (clone1)	<i>N. fasciatus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	-	1,100	LT703447
Île de Bananec/France	<i>N. fasciatus</i>	<i>Crocidura russula</i>	1	1,100	LT158053
Dinant/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	Muridae	2	1,100	LT158056-57
ITS2					
Dos Hermanas/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	3	318	LN881537
Dos Hermanas /Spain (clone 1)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	318	LN881542
Dos Hermanas /Spain (clone 2 and 3)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	318	LN881541
Granada/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	5	318	LN881537
Granada/Spain (clone 1, 2 and 4)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	318	LT703443
Granada/Spain (clone 3)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	318	LT703444
Granada/Spain (clone 5)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	318	LT703445
Granada/Spain (clone 6)	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	-	318	LT703446
El Hierro/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Mus</i> sp.	4	318	LN881537
Chertal/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	3	318	LT158059
Île de Bananec/France	<i>N. fasciatus</i>	<i>Crocidura russula</i>	1	318	LT158058
Dinant/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	Muridae	6	318	LT158060
Aznalcázar/Sevilla	<i>P. meridionalis</i>	-	3	1,121	LT604124
18S					
Dos Hermanas/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	3	1,153	LN881535
Granada/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	5	1,153	LN881536
El Hierro/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Mus</i> sp.	3	1,153	LN881535
Chertal/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	2	1,153	LT158061
Dinant/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	Muridae	1	1,153	LT158061
Aznalcázar/Sevilla	<i>P. meridionalis</i>	-	3	1,061	LT604123
cox1					
Dos Hermanas/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	3	658	LN881545-47
Granada/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	5	658	LN881548-52
El Hierro/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Mus</i> sp.	3	658	LN881553
Chertal/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	2	658	LT158041-42
Île de Bananec/France	<i>N. fasciatus</i>	<i>Crocidura russula</i>	1	658	LT158040
Aznalcázar/Sevilla	<i>P. meridionalis</i>	-	2	658	LT604125-26

Table 1. (Cont.)

Location/Country	Species	Host	Number of fleas	Base pairs (bp)	Accession number
<i>cytb</i>					
Dos Hermanas/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	3	374	LN897460
Granada/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Rattus</i> sp.	6	374	LN897461-66
El Hierro/Spain	<i>N. barbarus</i>	<i>Mus</i> sp.	3	374	LN897467-69
Chertal/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	3	374	LT158043-44, LT158047
Île de Bananec/France	<i>N. fasciatus</i>	<i>Crocidura russula</i>	1	374	LT158052
Dinant/Belgium	<i>N. fasciatus</i>	Muridae	6	374	LT158045-46, LT158048-51
Aznalcázar/Sevilla	<i>P. meridionalis</i>	-	3	374	LT604127-28

In order to assess the similarity among all marker sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* obtained in this study and with other *Nosopsyllus* species obtained from GenBank, we analysed the number of base differences per sequences from between sequences studied using no. of differences method of MEGA 5 program version 5.2 (Tamura et al. 2011).

Concatenated phylogenetic tree was inferred using nucleotide data and produced by Bayesian inference method (BI) using MrBayes-3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). JMODELTEST (Posada, 2008) program was used to determinate the best-fit substitution model for the parasite data: GTR+I+G dataset for 18S and *cox1* and TrN+I+G for *cytb* dataset. Models of evolution were chosen for subsequent analyses according to the Akaike Information Criterion (Huelsenbeck & Rannala 1997; Posada & Buckley 2004). For the study of the dataset containing the concatenation of three markers (*cox1*, *cytb* and 18S), analyses based on BI were partitioned by gene and models for individual genes within partitions were those selected by jModeltest. The commands used in MrBayes-3.2.6 for BI were nst=6 with invgamma rates (18S and *cox1*) and nst=2 with invgamma rates (*cytb*). For BI, the standard deviation of split frequencies was used to assess if the number of generations completed was sufficient; the chain was sampled every 500 generations and each dataset was run for 10 million generations. Adequacy of sampling and run convergence was assessed using the effective sample size diagnostic in TRACER program version 1.6 (Rambaut & Drummond, 2007). Trees from the first million generations were discarded based on an assessment of convergence. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) is percentage converted.

Concatenated (18S, *cox1* and *cytb*) phylogenetic tree was performed using our sequences and those obtained from GenBank database (Appendix 1) and were rooted including outgroup species representing members of the order Mecoptera: *Panorpa meridionalis*.

Results

Morphological results

65 fleas were collected from rodents from different localities (Table S1). The morphological study of fleas from rodents from different geographical regions (see Table S1) revealed the existence of two species: *N. fasciatus* and *N. barbarus*. All specimens analyzed in this work showed typical generic morphological characteristics of *Nosopsyllus* spp. (Figure 1):

- Hind tibiae with an apical tooth (Figure 1a).
- Hind tarsus with apical setae of second segment (tarsomere) not reaching back as far as end of third segment (Figure 1b).
- Pronotal ctenidium present and genal ctenidium absent (Figure 1c) and unmodified first segment of the antenna, antennal pit posteriorly opened and ocular row with uppermost setae inserted in front of well-developed eye (Figure 1c)
- Rounded head with a pointed frontal tubercle (Figure 1d).
- Front femur with lateral setae row (Figure 1e).
- Metanotum and abdominal tergites presenting more than one setae row, the anterior one usually vestigial or absent (Figure 1f).

Specific morphological identification was in agreement with that made by our colleagues. All individuals from different localities in Belgium, Portugal and France were morphologically identified as *N. fasciatus*, while those from Spain and Morocco were *N. barbarus* (see Table S1).

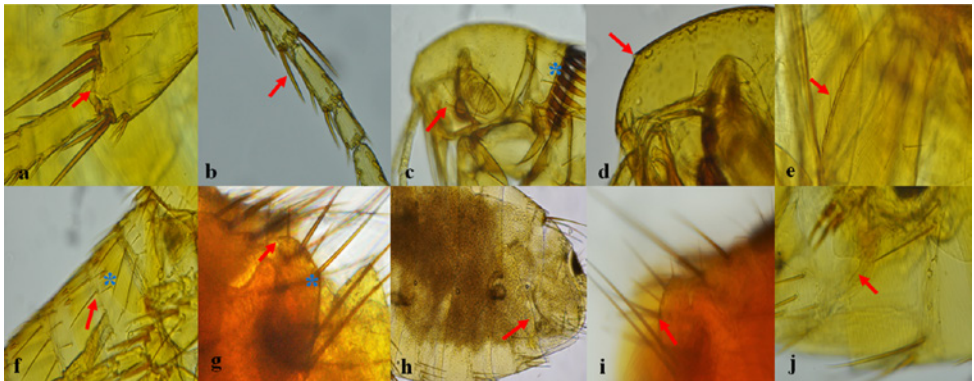


Figure 1. Morphological generic characteristics of *Nosopsyllus* spp., *N. barbarus* and *N. fasciatus*. a- Meta tibia with an apical tooth (arrow). b- Apical setae (arrowed) of second segment of hind tarsus not reaching back as far as end of third segment. c- Ocular row (red arrow) with uppermost setae inserted in front of well-developed eye and pronotal ctenidium (blue arrow). d- Head with a pointed frontal tubercle (arrow). e- Arrow points a lateral setae row of front femur. f- Tergites with two setae row (red and blue arrow). g- Male of *N. fasciatus* ventral margin of telomere, red arrow points the lower setae of the apex and blue arrow points the protruding apical tooth. h- Male of *N. barbarus* ventral margin of telomere, arrow points the lower setae of the apex. i- Female of *N. fasciatus*, arrow points the ventral margin of sternum VII. j- Female of *N. barbarus*, arrow points an apical lobe on the ventral margin of sternum VII.

Male individuals classified as *N. fasciatus* showed a slightly rounded telomere with a protruding apical tooth (Figure 1g). Furthermore, the lower seta of the ventral margin of the telomere was placed above the middle of the ventral margin of the apex (Figure 1g). On the other hand, females of *N. fasciatus* showed a posterior margin of sternum VII with a straight profile ending on right angle to the ventral margin (Figure 1h) although in some individuals a very shallow sinus near the lower margin of the sclerite was noticed.

The specimens from different regions of Spain and Morocco (see Table S1) showed typical morphological characteristics of *N. barbarus*. In male specimens, a protruding apical tooth of the apex was not noticed, and the two setae on the ventral margin appeared more spread out, the lower one being placed at the middle of the margin (Figure 1i). Despite the fact that these characteristics were noticed in most *N. barbarus* male specimens, some of them appeared morphologically less characterised, which could hardly allow us a definite discrimination between the two species. Unlike male individuals, female specimens classified as *N. barbarus* were easily discriminated from *N. fasciatus*, since they showed an apical lobe of variable size, which subtended a little sinus of variable size on the posterior margin of VII sternum (Figure 1j).

Molecular results

Partial 18S rRNA gene analysis

Partial 18S rRNA gene sequences of different populations of *N. barbarus* and *N. fasciatus* were 1,153 base pairs (bp) in length (Table 1). No differences were observed between partial 18S rRNA gene sequences from *N. fasciatus* and *N. barbarus* from El Hierro and Dos Hermanas, whereas, *N. barbarus* from Granada showed one different base pair placed on 563 position.

Internal Transcribed Spacer 1 and 2 (ITS1 and ITS2) analysis

The length of the ITS1 and ITS2 regions of *N. barbarus* and *N. fasciatus* isolated from different hosts and localities was 1,100 bp and 318 bp, respectively (Table 1).

ITS2 intra-individual similarity studied in ten clones of one individual of *N. barbarus* from Dos Hermanas ranged from 99.1 % to 100 %. Nevertheless, no inter-specific, intraspecific and intra-population differences among ITS2 sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* were noticed.

ITS1 intra-individual similarity in ten clones of one individual of *N. barbarus* from Granada ranged from 99.7 % to 100 %. ITS1 sequences of *N. barbarus* specimens from the same geographical origin were identical (Intra-population similarity = 100 %), whereas the intraspecific similarity ranged from 99.5 % to 99.7 %. On the other hand, in *N. fasciatus* intra-population similarity ranged from 99.9 % to 100 % while intraspecific similarity ranged from 99.8 % to 100 %.

Inter-specific similarity among ITS1 sequences *N. barbarus* and *N. fasciatus* ranged from 99.4 % to 100 % (table not shown).

Partial *Cox1* mtDNA gene analysis

The partial *cox1* mtDNA sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* isolated from different hosts and geographical origins were 658 bp in length (Table 1). A percentage of intra-population similarity in *N. barbarus* ranged from 98.0 % (Granada) to 100 % (El Hierro), whereas in *N. fasciatus* this value was 98.1 % (Chertal). Intraspecific similarity in *N. barbarus* ranged from 95.8 % (El Hierro-Granada) to 99.1 % (Dos Hermanas-Granada). In relation to *N. fasciatus* this value ranged from 95.0 % to 95.9 % (Chertal-Île de Bananec) (Table 2). The inter-specific similarity ranged from 95.0 % to 100 %, when we compared *N. barbarus* and *N. fasciatus* *cox1* sequences, whereas this value was considerably lower when we compared *N. barbarus* and *N. fasciatus* with *N. laeviceps ellobii* and *N. laeviceps kuzenkovi* *cox1* sequences (87.9 %–88.4 %) and (88.4 %–88.5 %) respectively (Table 2).

Partial *Cytb* mtDNA gene analysis

The length of the *cytb* mtDNA sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* isolated from different hosts and geographical origins were 374 bp (Table 1). Intra-population similarity in *N. barbarus* ranged from 98.4 % (El Hierro) to 100 % (Granada and Dos Hermanas), whereas in *N. fasciatus* ranged from 98.1 % (Chertal) to 99.7 % (Dinant) (Table 3). Intraspecific similarity in *N. barbarus* ranged from 96.8 % to 98.7 % (El Hierro-Granada). In relation to *N. fasciatus* this value ranged from 97.6 % (Chertal-Dinant) to 100 % (Chertal-Dinant) (Table 3). On the other hand, the percentage of inter-specific similarity assessment ranged from 96.5 % to 99.7 % when we compared *N. barbarus* and *N. fasciatus* *cytb* sequences (Table 3). This percentage was considerably lower when we compared *N. barbarus* and *N. fasciatus* with *N. laeviceps ellobii* and *N. iranus theodori* *cytb* sequences. Thus, minimum value of similarity was 84.6 % (*N. laeviceps ellobii*-*N. barbarus*) while the maximum value of similarity was 87.7 % (*N. iranus theodori*-*N. barbarus*) (Table 3). It is noteworthy that inter-specific similarity observed between *N. iranus* and *N. laeviceps* was slightly higher (92.0 %).

The concatenated dataset of partial 18S gene and partial *cytb* and *cox1* genes sequences included 1,292 aligned sites and 39 taxa, including outgroups. Phylogenetic analyses of the concatenated dataset yielded a tree with branches strongly supported (Figure 2). Phylogenetic tree topology showed two main clades. In the first one, species belonging to family Pulicidae clustered together, whereas in the second one, *N. fasciatus* and *N. barbarus* individuals from different hosts and geographical areas clustered together with specimens from family Ceratophyllidae, Leptopsyllidae and Ischnopsyllidae. Furthermore, two subclades could be noticed (Figure 2): One subclade clustered all *Nosopsyllus* species, while *N. fasciatus* from Chertal (Belgium) clustered together with *N. barbarus* from Granada (Spain) and separated of *N. barbarus* from El Hierro (Spain), *N. fasciatus* from Île de Bananec (France) and *N. barbarus* from Dos Hermanas (Spain). The second subclade clustered the remaining Ceratophyllidae species together with *Ophthalmopsylla kiritschenkoi* (Leptopsyllidae).

Table 2. Intra-population (*), intraspecific and inter-specific similarity observed among all the partial *cox1* mtDNA gene sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* from different geographical areas obtained in this work and other *Nosopsyllus* species from GenBank database. Values are given in percentages.

		<i>Cox1</i>					
	<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Dos Hermanas, Spain	<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Granada, Spain	<i>Nosopsyllus barbarus</i> from El Hierro, Spain	<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Chertal, Belgium	<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Île de Bananec, France	<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i> KM890985	<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i> KM890987
<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Dos Hermanas, Spain	99.2–99.7*						
<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Granada, Spain	98.2–99.1	98.0–99.2*					
<i>Nosopsyllus barbarus</i> from El Hierro, Spain	96.5–96.8	95.8–97.7	100*				
<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Chertal, Belgium	98.1	97.1–98.6	95.0–95.9	98.1*			
<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Île de Bananec, France	96.5–96.8	95.8–97.7	100	95.0–95.9	-		
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i> KM890985	87.9–88.4	87.9–88.4	88.4	88.4–88.5	88.4	-	
<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i> KM890987	87.9–88.4	87.9–88.4	88.4	88.4–88.5	88.4	100	-

Table 3. Intra-population (*), intraspecific and inter-specific similarity observed among all the partial *cytb* mtDNA gene sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* from different geographical areas obtained in this work and other *Nosopsyllus* species from GenBank database. Values are given in percentages.

		<i>Cytb</i>						
	<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Dos Hermanas, Spain	<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Granada, Spain	<i>Nosopsyllus barbarus</i> from El Hierro, Spain	<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Chertal, Belgium	<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Dinant, Belgium	<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Île de Bananec, France	<i>Nosopsyllus inanus theodori</i> KM890603	<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i> KM890720
<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Dos Hermanas, Spain	100*							
<i>Nosopsyllus barbarus</i> from Granada, Spain	97.0–97.8	99.2–100*						
<i>Nosopsyllus barbarus</i> from El Hierro, Spain	97.0–98.1	96.8–98.7	98.4–99.7*					
<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Chertal, Belgium	96.5–98.4	98.4–99.5	96.5–98.7	98.1–99.5*				
<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Dinant, Belgium	97.3–97.6	98.1–99.7	96.8–99.2	97.6–100	98.9–99.7*			
<i>Nosopsyllus fasciatus</i> from Île de Bananec, France	97.6	98.4–98.7	97.8–98.9	97.8–98.7	98.7–99.2	-		
<i>Nosopsyllus inanus theodori</i> KM890603	86.8	86.8–87.7	87.1–87.4	86.6–86.8	86.6–87.4	87.4	-	
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i> KM890720	85.2	85.2–86.1	84.6–84.9	85.2	84.9–85.8	85.8	92	-

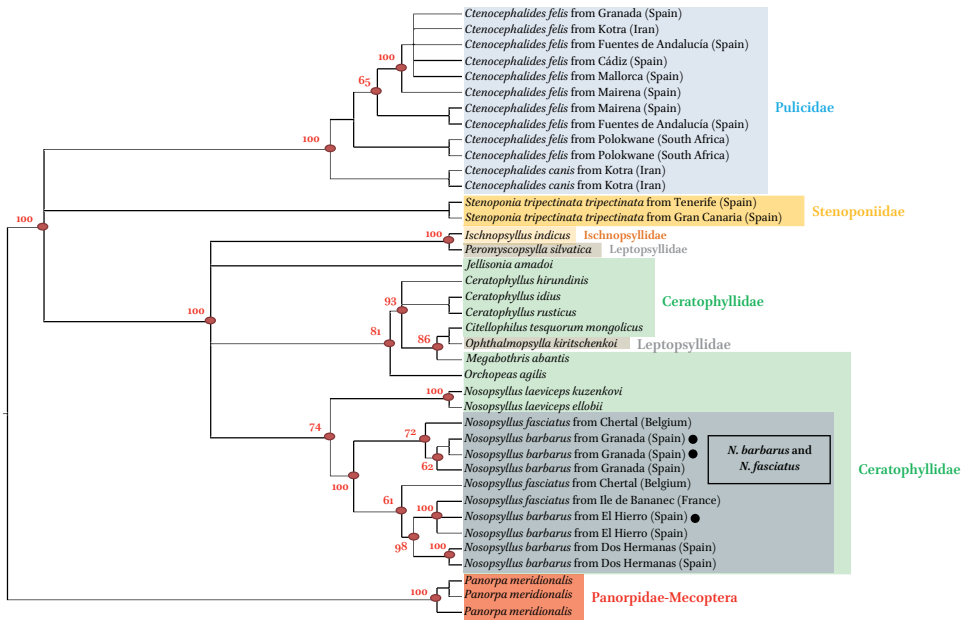


Figure 2. Phylogenetic tree of *Nosopsyllus barbarus* and *Nosopsyllus fasciatus* from different geographical origins (see Table 1) based on concatenated partial 18S ribosomal RNA gene, and partial cytochrome *c*-oxidase 1 (*cox1*) and cytochrome *b* (*cytb*) genes of mitochondrial DNA inferred using the Bayesian (B) method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown on the branches. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) are percentage converted. (●) Flea male individuals showing morphological characteristics overlapping both species.

Discussion

There has been a long controversy in the scientific community among advocates of classical morphological and modern molecular taxonomic identification for a long time (Ebach & Holdrege 2005). We agree with Tautz et al. (2003) and DeSalle et al. (2005), that genomic information should be an active component of modern taxonomy, but DNA sequencing should not be the sole source of information. In this context, the combination of both molecular and morphological data has become more frequent in recent flea taxonomic studies. Moreover, we totally agree with Whiting et al. (2008) who argued that the majority of characters used for species diagnoses in fleas are based on the shape and structure of their extraordinarily complex genitalia, or the presence and distribution of setae and spines. Nevertheless, although these characters could be useful for species diagnoses, they are mostly autapomorphic at the species level and of limited utility for phylogenetic reconstruction. In the last three decades, mitochondrial DNA has been extensively analysed (Ballard & Whitlock, 2004) and proven to be an important tool in species delineation as it possesses biological properties making it suitable as a marker for molecular biodiversity (Moore, 1995; Hebert et al. 2003). Partial DNA sequences of the mitochondrial gene such as cytochrome *c* oxidase I (*cox1*) and other molecular markers have been used to identify and discovery of new species

(DNA barcoding). Several studies have shown that a 658 bp fragment of *cox1* can be used as a DNA barcode to identify and distinguish between animal species (Hebert et al. 2004; Ward et al. 2005). The combination of morphological and molecular analyses provides more solid and reliable results, reducing the possibility of erroneous conclusions. In our opinion, DNA barcoding represents an extraordinary resource for the development of new taxonomic hypotheses within Siphonaptera, which should be confirmed by comparison with previously published and future flea studies.

The present paper represents the first study that provides morphological, molecular and phylogenetic comparative data of *Nosopsyllus fasciatus* and *N. barbarus* in order to assess taxonomic and phylogenetic relationships between the two species.

Morphologically, several authors (Jordan & Rothschild 1912; Lewis 1967; Has-triter & Tipton 1975; Beaucournu & Launay 1990; Lewis 1993; Giannetto et al. 1997; Acosta & Morrone 2003) have previously pointed out the taxonomic similarity between these two species. Thus, both species have usually been separated based on the presence or absence of an apical lobe of variable size in the posterior margin of sternum VII in females, whereas male specimens usually have been classified on the basis on the distribution and position of the ventral margin setae of the telomere. Nevertheless, Lewis (1967), Beaucournu & Launay (1990) and Giannetto et al. (1997) have previously noticed the absence of differential morphological characteristics in male specimens of *N. barbarus* and *N. fasciatus* and the presence of male individuals showing morphological characteristics overlapping both species. Lewis (1967) and Beaucournu & Launay (1990) argued that certain monotypic species such as *N. fasciatus* could represent different subspecies, whereas certain subspecies admitted by some authors, could just be a morphological variant belonging to a polymorphic taxon. This fact is corroborated in our study, in which only female specimens were able to be specifically differentiated using morphological criteria. This observation could be the consequence of a wrong identification practice of males based on morphological differences of female specimens or the geographic origin as a valid criterion for the identification between the two species. Furthermore, phylogenetic tree constructed in this study showed these morphological “hybrid” male individuals (Figure 2, black point) clustering together with the remaining *N. barbarus* and *N. fasciatus* specimens without a specific phylogenetic pattern.

On the other hand, the presence or absence of an apical lobe of variable size in the posterior margin of sternum VII in females only might be due to a location effect rather than to a discriminative species character since *N. barbarus* has been geographically restricted to Mediterranean islands and east African subregion, whereas *N. fasciatus* has a cosmopolitan distribution. The presence of *N. barbarus* in the southwest region of Spain (Dos Hermanas, Sevilla), is reported for the first time in this work, which support the establishment of this morphospecies in the South Spain. Furthermore, in agreement with Beaucournu & Launay (1990) we noticed both species shared the same hosts, *Rattus rattus*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus spretus* being the most common.

The ITS2 sequences of both species were markedly shorter than ITS1 sequences. Vobis et al. (2004), Zurita et al. (2015) and Zurita et al. (2016) reported this fact in other species of fleas such as *C. felis*, *Stenoponia tripectinata tripectinata* and *C. canis*, respectively.

Since ribosomal DNA repeats usually in the genome tandemly and includes polymorphism in nucleotide sequence, we studied the degree of variation within an individual by sequencing different clones of the same individual. Thus, the intraindividual similarity was higher than 99 % for both markers. Otherwise, no differences or slight differences (<0.5 %) were found in the ITS2 and ITS1 sequences, respectively, of *N. barbarus* and *N. fasciatus* from different geographical regions and hosts. Similar results were reported by Gamerschlag et al. (2008) and Luchetti et al. (2007) who studied the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species. Marrugal et al. (2013) and Zurita et al. (2016) found that the analyses of ITS1 and ITS2 markers in flea specimens are helpful tools to approach different taxonomic issues at the species level. These authors found a lack of variation among ITS sequences among individuals belonging to the same flea species even when they were isolated from different geographical origins and hosts. However, they noticed substantial nucleotide differences when they compared ITS sequences from different flea species even when they analysed congeneric species. Thus, Marrugal et al. (2013) and Zurita et al. (2016) reported an inter-specific similarity ranging from 91.8 % to 96 % between ITS sequences of *C. felis* and *C. canis* isolated from dogs from different geographical areas. According to the high inter-specific similarity (ITS1 > 99.5 %; ITS2 = 100 %) observed among ITS sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* we could conclude that *N. barbarus* and *N. fasciatus* are synonymous. Thus, in agreement with Marrugal et al. (2013) who studied *Ctenocephalides* species from dogs, the morphological differences observed between *N. barbarus* and *N. fasciatus* did not correspond with different ITS sequences.

It is clear that the mitochondrial genome of animals is a better target for analysis than the nuclear genome because of its lack of introns, its limited exposure to recombination and its haploid mode of inheritance (Saccone et al. 1999). The cytochrome c-oxidase 1 gene (*cox1*) does have two important advantages. Firstly, the universal primers for this gene are very robust, enabling recovery of its 5' end from representatives of most, if not all, animal phyla (Folmer et al. 1994; Zhang & Hewitt 1997). Secondly, *cox1* appears to possess a greater range of phylogenetic signal than any other mitochondrial gene. In fact, the evolution of this gene is rapid enough to allow the discrimination of not only closely allied species, but also phylogeographic groups within a single species (Cox & Hebert 2001; Wares & Cunningham 2001). The partial *cox1* mtDNA gene sequences of *N. barbarus* and *N. fasciatus* isolated from different hosts and geographical origins were 658 bp in length. Our results showed an interspecific similarity overlapping the intraspecific similarity in both species (Table 2). Previous studies showed fleas have a high level of intraspecific genetic variation (de la Cruz & Whiting 2003; Brinkerhoff et al. 2011). DNA barcoding studies on insects and invertebrates have shown maximum intraspecific variation ranging from 3 to 3.9 % (Carew et al. 2007). This high degree of polymorphism for intraspecific analysis could be explained attending to wide geographical localities where the samples were collected. Indeed, in certain groups, such as amphibians, when several individuals of a species they come from distant geographical regions, intraspecific variation can exceed the inter-specific variation observed between species of the same genus, making it difficult for the delimitation of species with only

the sequence of *cox1* (Vences et al. 2005). In these cases has been suggested sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS).

On the other hand, inter-specific similarity percentage observed in both mitochondrial markers between the two species and *N. laeviceps* and *N. iranus* was considerably lower than observed between *N. barbarus* and *N. fasciatus* (Table 2).

Concatenated phylogenetic tree revealed both species clustering together with high support without a specific distribution pattern and separated from other *Nosopsyllus* species suggesting that there is no reason to consider the two morphospecies (*N. fasciatus* and *N. barbarus*) as two different species, supporting the idea that *N. fasciatus* and *N. barbarus* are synonymous. Furthermore, based on concatenated phylogenetic tree we could reinforce the idea reported by Whiting et al. (2008) who placed Leptopsyllidae and Ischnopsyllidae as sister families to Ceratophyllidae.

In conclusion, the present study provides for the first time comparative morphological and molecular data of *N. barbarus* and *N. fasciatus* in order to resolve the unclear taxonomic status of both species. On the basis on morphological results, we conclude that the distribution and position of the ventral margin setae of the telomere in males, and the presence or absence of an apical lobe of variable size in the posterior margin of sternum VII in females, are not a valid specific diagnostic character to differentiate *N. barbarus* and *N. fasciatus*. This means that these characters were erroneously used in the past to separate both species. Furthermore, based on phylogenetic and molecular comparative studies of two nuclear markers (ITS1 and ITS2), two mitochondrial markers (*cox1* and *cytb*) and concatenated sequences of both species, we conclude that there are no solid arguments to consider these two “morphospecies” as two different species and therefore, we propose *N. barbarus* as a junior synonym of *N. fasciatus*.

The present study supports and reinforce the proposal of Holland (1964) that fleas appear to have many instances of parallel evolution of morphology (via both structural losses and modification), probably associated with multiple invasions of similar hosts, which further obscures homology.

Acknowledgement

The present work was supported by a grant of the V Plan Propio de Investigación of the University of Seville, Spain. We thank to Carlos Feliu and M^a Soledad Gómez (University of Barcelona), Jose Manuel Barreda Rivas (Andalusian Society of Entomology), Roland Libois (University of Liège) and Jean Claude Beaucournu (University of Rennes) for providing some of the samples. We thank Mrs. Anne Kendall for the critical reading of the manuscript.

References

- Acosta, R. & Morrone, J.J. (2013) Phylogenetics of the tribe Phalacropsyllini (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Neopsyllinae) based on molecular and morphological evidence. *Zootaxa* **3630**: 333–346.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria, *Molecular Ecology* **13**: 729–744.

- Beaucournu, J.C. & Alcover, J.A. (1984) "Siphonaptera from small terrestrial mammals in the Pitouysic Islands" in *Biogeography and Ecology of the Pitouysic Island*. Kuhnier, H., Alcover, J.A. & Gueraud'Arellano Tur ed., 377–392.
- Beaucournu, J.C. & Launay, H. (1990) *Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental, Faune de France*, Vol. 76. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris.
- Bosc, L.A.G. (1800) Description d'une nouvelle espèce de puce (*Pulex fasciatus*). *Bulletin des sciences, par la Société Philomatique, Paris*, 2:156.
- Brinkerhoff, R.J., Martin, A.P., Jones, R.T. & Collinge, S.K. (2011) Population genetic structure of the prairie dog flea and plague vector, *Oropsylla hirsuta*. *Parasitology* 138: 71–79.
- Cox, A.J. & Hebert, P.D.N. (2001) Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10: 371–386.
- Carew, M.E., Pettigrove, V., Cox, R.L. & Hoffmann, A.A. (2007) DNA identification of urban *Tanytarsini chironomids* (Diptera: Chironomidae). *Journal of the North American Benthological Society* 26: 587–600.
- Cutillas, C., Callejón, R., de Rojas, M., Tewes, B., Ubeda, J.M., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2009) *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica* 111: 299–307.
- De la Rúa, N., Stevens, L. & Dorn, P.L. (2011) High genetic diversity in a single population of *Triatoma sanguisuga* (LeConte, 1855) inferred from two mitochondrial markers: Cytochrome b and 16S ribosomal DNA. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 671–677.
- De Rojas, M., Mora, M.D., Ubeda, J.M., Cutillas, C., Navajas, M. & Guevara, D.C. (2002) Phylogenetic relationships in rhinonyssid mites (Acari: Rhinonyssidae) based on ribosomal DNA sequences: insights for the discrimination of closely related species. *Parasitology Research* 88: 675–681.
- De Rojas, M., Ubeda, J.M., Cutillas, C., Mora, D., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2007) Utility of ITS1-5.8S-ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the genus *Rhinonyssus*: the *Rhinonyssus coniventris* complex. *Parasitology Research* 100: 1041–1046.
- DeSalle, R., Egan, M.G. & Siddall, M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Serie B, Biological Sciences* 360: 1905–1916.
- Dittmar, K. & Whiting, M.F. (2003) Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (CytB and CoII). *Parasitology Research* 91: 55–59.
- Drouin, G. & de Sá, M.M. (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Molecular Biology and Evolution* 12: 481–493.
- Durden, L.A. & Traub, R. (2002) *Medical and veterinary entomology*, vol.7. Academic Press, San Diego, California.
- Ebach, M.C. & Holdrege, C. (2005) More taxonomy, not DNA Barcoding. *Bio-Science* 55: 822–823.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797.
- Erster, O., Roth, A., Wolkomirsky, R., Leibovich, B. & Shkap, V. (2013) Comparative analysis of mitochondrial markers from four species of *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 198: 364–370.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 3: 294–299.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. & Hurst, G.D. (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541–4550.
- Gamerschlag, S., Mehlhorn, H., Heukelbach, J., Feldmeier, H. & D'Haese, J. (2008) Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). *Parasitology Research* 102: 193–199.

- Gasser, R.B., Nansen, P. & Guldberg, P. (1996) Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Molecular Cellular Probes* **10**: 99–105.
- Gerbi, S.A. (1986) The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *Biosystems* **19**, 257–258.
- Giannetto, S., Virga, A. & Iori, A. (1997) New record of *Nosopsyllus* (*Nosopsyllus*) *barbarus* (Jordan and Rothschild, 1912) (Aphaniptera: Dolichopsyllidae) from Sicily. Morphology at scanning electron microscopy of *N. (N.) barbarus* and *N. (N.) fasciatus* (Bosc D'Antic, 1800). *Parassitologia* **39**: 29–32.
- Gil Collado, J. (1949) Pulgas españolas parásitas de roedores. *Revista Ibérica de Parasitología* **9**: 214–258.
- Gissi, C., Iannelli, F. & Pesole, G. (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* **101**: 301–320.
- Hastriter, M.W. & Tipton, V.J. (1975) Fleas (Siphonaptera) associated with small mammals of Morocco. *The Journal of the Egyptian Public Health Association* **50**: 79–169.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & De Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* **270**: 313–321.
- Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S. & Francis, C.M. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* **2**: 312.
- Holland, G.P. (1964) Evolution, classification, and host relationships of Siphonaptera. *Annual Review of Entomology* **9**: 123–146.
- Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**: 227–232.
- Jordan, K. & Rothschild, N.C. (1912) On Siphonaptera collected in Algeria. *Novitates Zoologicae* **19**: 357–372.
- Kaewmongkol, G., Kaewmongkol, S., McInnes, L.M. et al. (2011) Genetic characterization of flea derived *Bartonella* species from native animals in Australia suggest host-parasite co-evolution. *Infection, Genetics and Evolution* **11**: 1868–1872.
- Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, M. & Slapeta, J. (2014) High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology* **28**: 330–336.
- Lewis, R.E. (1967) Contributions to a taxonomic revision of the genus *Nosopsyllus* Jordan, 1933. *Journal of Medical Entomology* **4**: 123–142.
- Lewis, R.E. (1990) The Cceratophyllidae: Currently Accepted Valid Taxa (Insecta: Siphonaptera). Ed. Koenigstein. Koeltz Scientific Books, Germany.
- Lewis, R.E. (1993) Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Journal of Medical Entomology* **30**: 239–256.
- Lopez-Osorio, F., Pickett, K.M., Carpenter, J.M., Ballif, B.A. & Agnarsson, I. (2014) Phylogenetic relationships of yellow jackets inferred from nine loci (Hymenoptera: Vespidae, Vespinae, *Vespula* and *Dolichovespula*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **73**: 190–201.
- Luchetti, A., Trentini, M., Pampiglone, S., Fiorawanti, M.L. & Mantovani, B. (2007) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) and fleas across South America and Africa. *Parasitology Research*, **100**: 593–598.
- Márquez, F.J. & Salas, R. (1990) Presencia de *Echidnophaga murina* (Siphonaptera, Pulicidae) y de *Nosopsyllus barbarus* (Siphonaptera, Ceratophyllidae) en la Península Ibérica. *Revista Ibérica de Parasitología* **50**: 117–121.
- Marangi, M., Cantacessi, C., Sparagano, O.A., Camarda, A. & Giangaspero, A. (2014) Molecular characterization and phylogenetic inferences of *Dermanyssus gallinae* isolates in Italy within an European framework. *Medical and Veterinary Entomology* **28**: 447–452.
- Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research* **112**: 2289–2298.
- Mckern, J.A., Szalanski, A.L., Austin, J.W. & Gold, R.E. (2008) Genetic diversity of field populations of the cat flea, *Ctenocephalides felis*, and the human flea, *Pulex irritans*, in the South Central United States. *Journal of Agricultural and Urban Entomology* **25**: 259–263.

- Monje, L.D., Quiroga, M., Manzoli, D. et al. (2013) Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from *Philornis seguyi* (García, 1952) and *Philornis torquans* (Nielsen, 1913) (Diptera: Muscidae). *Systematic Parasitology* **86**: 41–53.
- Moore, W.S. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* **49**: 718–726.
- Navajas, M. & Navia, D. (2010) DNA-based methods for eriophyoid mite studies: review, critical aspects, prospects and challenges. *Experimental & Applied Acarology* **51**: 257–271.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253–1256.
- Posada, D. & Buckley, T.R. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* **53**: 793–808.
- Rambaut, A. & Drummond, A. (2007). Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Saccone, C., DeCarla, G., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. (1999) Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* **238**: 195–210.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Tautz, D., Acrtander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P. (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 70–74.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. & Vieites, D.R. (2005) Comparative Performance of the 16S rRNA Gene in DNA Barcoding of Amphibians. *Frontiers in Zoology* **2**: 5.
- Vobis, M., D'Haese, J., Mehlhorn, H. et al. (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research* **94**: 219–226.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. (2005) DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **360**: 1847–1857.
- Wares, J.P. & Cunningham, C.W. (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* **12**: 2455–2469.
- Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W. & Dittmar, K. (2008) A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics* **24**: 677–707.
- Yong, H.S., Lim, P.E., Tan, J., Ng, Y.F., Eamsobhana, P. & Suana, I.W. (2014) Molecular phylogeny of *Orthetrum* dragonflies reveals cryptic species of *Orthetrum pruinosum*. *Scientific Reports* **4**: 5553.
- Zagoskin, M.V., Lazareva, V.I., Grishanin, A.K. & Mukha, D.V. (2014) Phylogenetic information content of Copepoda ribosomal DNA repeat units: ITS1 and ITS2 impact. *Biomed Research International* doi: 10.1155/2014/926342.
- Zhang, D.-X. & Hewitt, G.M. (1997) Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect Molecular Biology* **6**: 143–150.
- Zhu, Q., Hastriter, M.W., Whiting, M.F. & Dittmar, K. (2015) Fleas (Siphonaptera) are Cretaceous, and evolved with Theria. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **90**: 129–139.
- Zurita, A., Callejón, R., De Rojas, M., Gómez-López, M.S. & Cutillas, C. (2015) Molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny. *Bulletin of Entomological Research* **104**: 704–711.
- Zurita, A., Callejón, R., De Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C. (2016) *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*: introgressive hybridization?. *Systematic Entomology* **41**: 567–579.

Appendix 1. List of taxa used in the analysis, including GenBank accession numbers and host information.

Species	Family	Host	Accession number	Gen Region	Sequence Length (bp)
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	LN651166	18S	989
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	LN651167	18S	989
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LK937066	18S	1,095
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LK937067	18S	1,096
<i>Peromyscopsylla silvatica</i>	Leptopsyllidae	Unknown	EU336065	18S	1,868
<i>Ophthalmopsylla kiritschenkovi</i>	Leptopsyllidae	Unknown	KM891233	18S	1,788
<i>Ischnopsyllus indicus</i>	Ischnopsyllidae	Unknown	KM891230	18S	711
<i>Jellisonia amadoi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891260	18S	1,786
<i>Ceratophyllus hirundinis</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891203	18S	1,831
<i>Ceratophyllus idius</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891204	18S	710
<i>Ceratophyllus rusticus</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891205	18S	711
<i>Megabothris abantis</i>	Ceratophyllidae	Unknown	EU336049	18S	1,880
<i>Citellophilus tesquorum mongolicus</i>	Ceratophyllidae	<i>Citellus dauricus dauricus</i>	EU336103	18S	1,880
<i>Orchopeas agilis</i>	Ceratophyllidae	<i>Neotoma lepida</i>	EU336028	18S	1,880
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891226	18S	711
<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891228	18S	1,824
<i>Echidnophaga gallinacea</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	JN008921	<i>CoxI</i>	650
<i>Echidnophaga myrmecobii</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	JN008919	<i>CoxI</i>	649
<i>Echidnophaga iberica</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479239	<i>CoxI</i>	658
<i>Xenopsylla cunicularis</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479238	<i>CoxI</i>	658
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Meles meles</i>	KF479246	<i>CoxI</i>	658
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Meles meles</i>	KF479247	<i>CoxI</i>	658
<i>Spilopsyllus cuniculi</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479236	<i>CoxI</i>	658
<i>Spilopsyllus cuniculi</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479237	<i>CoxI</i>	658
<i>Spilopsyllus cuniculi</i>	Pulicidae	Mammal	JN008918	<i>CoxI</i>	652
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	LN827896	<i>CoxI</i>	600
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulicidae	Mammal	JN008917	<i>CoxI</i>	652
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Felis catus</i>	KF684891	<i>CoxI</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684196	<i>CoxI</i>	601
<i>Ctenocephalides felis strongylus</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684876	<i>CoxI</i>	601
<i>Ctenocephalides orientis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684871	<i>CoxI</i>	601
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684210	<i>CoxI</i>	658
<i>Neopsylla paranoma</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eospalax baileyi</i>	KJ471025	<i>CoxI</i>	1,532
<i>Neopsylla paranoma</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eospalax baileyi</i>	KJ471026	<i>CoxI</i>	1,532
<i>Neopsylla sellaris</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eospalax baileyi</i>	KJ471029	<i>CoxI</i>	1,532
<i>Acanthopsylla jordani</i>	Pygiopsyllidae	<i>Antechinus flavipes</i>	JN008916	<i>CoxI</i>	652
<i>Pygiopsylla hilli</i>	Pygiopsyllidae	<i>Bettongia penicillata</i>	JN008915	<i>CoxI</i>	652
<i>Pygiopsylla tunney</i>	Pygiopsyllidae	Mammal	JN008924	<i>CoxI</i>	651

(Continued)

Appendix 1. (Cont.)

Species	Family	Host	Accession number	Gen Region	Sequence Length (bp)
<i>Odontopsyllus quirosi quirosi</i>	Ceratophyllidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479240	<i>Cox1</i>	658
<i>Jellisonia amadoi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KF322091	<i>Cox1</i>	1,532
<i>Paraceras melis melis</i>	Ceratophyllidae	<i>Meles meles</i>	KF479245	<i>Cox1</i>	658
<i>Ceratophyllus hirundinis</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890962	<i>Cox1</i>	1,227
<i>Ceratophyllus rusticus</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890964	<i>Cox1</i>	1,212
<i>Ceratophyllus idius</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890963	<i>Cox1</i>	1,227
<i>Megabothris abantis</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891009	<i>Cox1</i>	1,251
<i>Orchopeas agilis</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM891014	<i>Cox1</i>	672
<i>Citellophilus tesquorum mongolicus</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890971	<i>Cox1</i>	1,251
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890985	<i>Cox1</i>	1,224
<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890987	<i>Cox1</i>	1,218
<i>Ishnopsyllus indicus</i>	Ishnopsyllidae	Unknown	KM890989	<i>Cox1</i>	1,251
<i>Peromyscopsylla silvatica</i>	Leptopsyllidae	Unknown	KM891006	<i>Cox1</i>	672
<i>Ophthalmopsylla kiritschenkoi</i>	Leptopsyllidae	Unknown	KM890974	<i>Cox1</i>	1,113
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LK937072	<i>Cox1</i>	677
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LK937071	<i>Cox1</i>	677
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Apodemus sylvaticus</i>	KF479243	<i>Cox1</i>	658
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Apodemus sylvaticus</i>	KF479244	<i>Cox1</i>	658
<i>Stenoponia americana</i>	Stenoponiidae	Unknown	KM891021	<i>Cox1</i>	1,251
<i>Stephanocircus dasyuri</i>	Stephanocircidae	Mammal	JN008920	<i>Cox1</i>	667
<i>Stephanocircus pectinipes</i>	Stephanocircidae	Mammal	JN008923	<i>Cox1</i>	654
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LN897473	<i>Cytb</i>	374
<i>Stenoponia tripectinata medialis</i>	Stenoponiidae	<i>Gerbillus dasyurus</i>	KM890602	<i>Cytb</i>	369
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	LN897470	<i>Cytb</i>	374
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	LN897471	<i>Cytb</i>	374
<i>Ctenocephalides felis damarensis</i>	Pulicidae	Unknown	KM890641	<i>Cytb</i>	369
<i>Archaeopsylla erinacei erinacei</i>	Pulicidae	Unknown	KM890725	<i>Cytb</i>	369
<i>Rhadinopsylla heiseri</i>	Ctenophthalmidae	<i>Ammospermophilus leucurus</i>	KM890594	<i>Cytb</i>	360
<i>Rhadinopsylla dahurica dahurica</i>	Ctenophthalmidae	Unknown	KM890715	<i>Cytb</i>	369
<i>Rhadinopsylla dahurica vicina</i>	Ctenophthalmidae	Unknown	KM890648	<i>Cytb</i>	366

Species	Family	Host	Accession number	Gen Region	Sequence Length (bp)
<i>Ctenophthalmus</i> sp.	Ctenophthalmidae	Unknown	KM890749	<i>Cytb</i>	369
<i>Ctenophthalmus</i> sp.	Ctenophthalmidae	Unknown	KM890745	<i>Cytb</i>	369
<i>Myodopsylla trisellis</i>	Ishnopsyllidae	<i>Myotis lucifugus</i>	KM890661	<i>Cytb</i>	369
<i>Ishnopsyllus indicus</i>	Ishnopsyllidae	Unknown	KM890724	<i>Cytb</i>	369
<i>Ishnopsyllus variabilis</i>	Ishnopsyllidae	Unknown	KM890694	<i>Cytb</i>	369
<i>Oropsylla hirsuta</i>	Ceratophyllidae	<i>Spermophilus variegatus</i>	KM890741	<i>Cytb</i>	366
<i>Thrassis pandorae pandorae</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890664	<i>Cytb</i>	369
<i>Foxella ignota</i>	Ceratophyllidae	<i>Geomys bursarius</i>	KM890593	<i>Cytb</i>	369
<i>Jellisonia amadoi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890755	<i>Cytb</i>	312
<i>Megabothris groenlandicus</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890659	<i>Cytb</i>	369
<i>Ceratophyllus ciliates kincaidi</i>	Ceratophyllidae	<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	KM890592	<i>Cytb</i>	369
<i>Ceratophyllus zhovtyi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890653	<i>Cytb</i>	363
<i>Ceratophyllus hirundinis</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890697	<i>Cytb</i>	363
<i>Ceratophyllus rusticus</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890699	<i>Cytb</i>	333
<i>Ceratophyllus idius</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890698	<i>Cytb</i>	306
<i>Citellophilus tesquorum mongolicus</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890706	<i>Cytb</i>	306
<i>Orchopeas agilis</i>	Ceratophyllidae	<i>Neotoma lepida</i>	KM890591	<i>Cytb</i>	369
<i>Megabothris abantis</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890746	<i>Cytb</i>	369
<i>Peromyscopsylla selenis</i>	Leptopsyllidae	<i>Peromyscus maniculatus</i>	KM890601	<i>Cytb</i>	360
<i>Peromyscopsylla himalaica</i>	Leptopsyllidae	Unknown	KM890645	<i>Cytb</i>	369
<i>Peromyscopsylla silvatica</i>	Leptopsyllidae	Unknown	KM890743	<i>Cytb</i>	369
<i>Ophthalmopsylla kiritschenkoi</i>	Leptopsyllidae	Unknown	KM890727	<i>Cytb</i>	306
<i>Nosopsyllus iranisi theodori</i>	Ceratophyllidae	<i>Gerbillus dasyurus</i>	KM890603	<i>Cytb</i>	369
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890720	<i>Cytb</i>	369
<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i>	Ceratophyllidae	Unknown	KM890722	<i>Cytb</i>	336

Morphological, biometrical and molecular characterization of *Archaeopsylla erinacei* (Bouché, 1835)

A. Zurita, R. Callejón, M. de Rojas and C. Cutillas*

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy,
 University of Seville, Profesor García González 2, 41012 Seville, Spain

Abstract

In the present work, we carried out a morphological, biometrical and molecular study of the species *Archaeopsylla erinacei* (Bouché, 1835) and their subspecies: *Archaeopsylla erinacei erinacei* (Bouché, 1835) and *Archaeopsylla erinacei maura* (Jordan & Rothschild, 1912) isolated from hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) from different geographical regions (Seville and Corse). We have found morphological differences in females of *A. erinacei* from the same geographical origin that did not correspond with molecular differences. We suggest that some morphological characters traditionally used to discriminate females of both subspecies should be revised as well as we set the total length of the spermatheca as a valid criterion in order to discriminate between both subspecies. The Internal Transcribed Spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2) and partial 18S rRNA gene, and partial cytochrome c-oxidase 1 (*cox1*) and cytochrome b (*cytb*) mtDNA gene sequences were determined to clarify the taxonomic status of these taxa and to assess intra-specific and intra-population similarity. In addition, a phylogenetic analysis with other species of fleas using Bayesian and Maximum Likelihood analysis was performed. All molecular markers used, except 18S, showed molecular differences between populations corresponding with geographical origins. Thus, based on the phylogenetic and molecular study of two nuclear markers (ITS1, ITS2) and two mitochondrial markers (*cox1* and *cytb*), as well as concatenated sequences of both subspecies, we reported the existence of two geographical genetic lineages in *A. erinacei* corresponding with two different subspecies: *A. e. erinacei* (Corse, France) and *A. e. maura* (Seville, Spain), that could be discriminated by polymerase chain reaction-linked random-fragment-length polymorphism.

Keywords: *Archaeopsylla erinacei*, morphology, molecular study, ribosomal DNA, mitochondrial DNA

(Accepted 22 November 2017)

Introduction

Siphonaptera is relatively a small order of secondarily wingless holometabolous insects. According to Beaucournu & Gomez-Lopez (2015) the order includes 2500 species 'of fleas'. In addition, 409 specific, 147 subspecific, 65 generic, and 7 subgenera names are considered to be synonymous

(Krasnov, 2008). The Siphonaptera fauna of the Palearctic region is the richest, including 96 genera and 892 species constituting a 38% of the total number of species known, and 38% of the known genera (Krasnov, 2008).

Within this order, the Pulicidae is the most studied family since most fleas of medical or veterinary importance (*Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans* or *Xenopsylla cheopis*) are members of this family. Pulicidae consists of 4 tribes, 21 genera, and 167 species. Some workers have treated Pulicidae as including Tungidae (Lewis, 1998); however, Whiting *et al.* (2008) placed this family as a monophyletic group and phylogenetically distant from Tungidae. Pulicidae exhibit an interesting diversity of host specificity patterns and

*Author for correspondence
 Phone: +34954556773
 Fax: +34 954 628162
 E-mail: cutillas@us.es

ecological habits (Whiting *et al.*, 2008). Certain species such as *Archaeopsylla erinacei* and *Spilopsyllus cuniculi* are monoxenous on hedgehog and rabbits respectively, while other Pulicidae species such as *C. felis* or *P. irritans*, are highly promiscuous, and occurs on a wide variety of Carnivora (Whiting *et al.*, 2008).

Although during the last 15 years molecular data has made a significant contribution (Dittmar & Whiting, 2003; Vobis *et al.*, 2004; Gamerschlag *et al.*, 2008; Whiting *et al.*, 2008; Marrugal *et al.*, 2013; Zurita *et al.*, 2016), for decades, the genus and species differentiation of fleas has been based on morphological criteria (the shape and structure of their complex genitalia, distribution of setae, spines, and ctenidia, etc) (Lane & Crosskey, 1993; Kramer & Mencke, 2001; Mehlhorn, 2001; Linardi & Santos, 2012). However, a few studies have been carried out on the molecular differentiation of fleas (Lawrence *et al.*, 2014; Zurita *et al.*, 2015). Thus, the scientific community has a great knowledge of flea taxonomy at the species and subspecies level, and enough information to assess their biology and role in disease transmission in recent years (Kaewmongkol *et al.*, 2011; Lawrence *et al.*, 2015). In contrast, a rigorous exploration of the phylogenetic relationships among fleas is needed in order to clarify their complex systematics (Whiting *et al.*, 2008). In this way, the few taxonomic and phylogenetic studies of fleas based on molecular data carried out in the last years have revealed that not all flea species previously described only by morphological methods have always remained as defined species. Recently, Zurita *et al.* (2018) based on a comparative morphological, phylogenetic and molecular study of *Nosopsyllus fasciatus* and *Nosopsyllus barbarus*, concluded that there were no solid arguments to consider these two 'morphospecies' as two different species and proposed *N. barbarus* as a junior synonym of *N. fasciatus*. These authors used two nuclear markers: Internal Transcribed Spacers 1 and 2 (ITS1 and ITS2) and two mitochondrial markers: cytochrome c-oxidase subunit 1 (*cox1*) and cytochrome b (*cytb*), in order to determine the taxonomic status of both species.

Previous studies showed that fleas have a high level of genetic intraspecific variation (Dittmar & Whiting, 2003; Brinkerhoff *et al.*, 2011). Thus, several authors in the last 10 years (Kaewmongkol *et al.*, 2011; Lawrence *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015; Zurita *et al.*, 2015, 2016) have used mitochondrial DNA markers such as *cox1*, *coxII* or *cytb* as reference molecular markers in order to investigate the phylogenetic and taxonomic relationships in fleas at family, genus and species level.

Genus *Archaeopsylla* Dampf, 1908 (Pulicidae) is a great example of the shortage of molecular and phylogenetic data in fleas' taxonomy. Based on morphological criteria, two species have been described within the *Archaeopsylla* genus (Pulicidae): *Archaeopsylla sinensis*, and *A. erinacei* with two subspecies: *Archaeopsylla erinacei erinacei* (Bouché, 1835), and *Archaeopsylla erinacei maura* (Jordan & Rothschild, 1911). Both species have a Palearctic distribution; however, *A. sinensis* occurs at East-Asian subregion, Siberian province; China, Russia (Medvedev *et al.*, 2005) whereas *A. erinacei* is distributed from European region to Mediterranean and North Africa area (Hopkins & Rothschild, 1953). Furthermore, *A. e. erinacei* is distributed from European and Mediterranean subregions, while the distribution of *A. e. maura* is possibly partly accounted by the artificial introduction of its host (the North African hedgehog, *Atelerix algirus*), primarily a North African form, which is stated to have, probably, been introduced into southern Spain (Dominguez, 2004), the Balearic Islands and south-eastern

France within historic times (Hopkins & Rothschild, 1953). Thus, we can say that both subspecies are sympatric along certain geographical areas where they coexist and particularly also in the Iberian Peninsula and south-eastern France. Furthermore, Hopkins & Rothschild (1953) and Beaucournu & Launay (1990) noticed that these two subspecies cohabit the same host (*Erinaceus europaeus*). These authors provided taxonomic keys based on morphological criteria in order to discriminate between the two subspecies; however, the close likeness of female specimens of *A. e. erinacei* and *A. e. maura* makes the differential diagnosis very difficult, especially when there are few males (easily differentiated), and when the specimens come from areas where the two subspecies coexist (Beaucournu & Launay, 1990).

The aim of this study was to carry out a comparative morphological, biometrical and molecular study of *A. erinacei* and their subspecies: *A. e. erinacei* and *A. e. maura* isolated from *Erinaceus europaeus* from Seville (southwestern of Spain) and Corse Island (France). Thus, the partial 18S rRNA gene, ITS1, ITS2 of the rDNA and partial *cox1* and *cytb* mtDNA gene of these taxa were sequenced in order to clarify their taxonomic status and to assess intra-specific and intra-population similarity. Furthermore, based on the sequences obtained and those of additional flea species retrieved from public databases, we also carried out a comparative phylogenetic analysis.

Materials and methods

Collection of samples

Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) trapping was conducted in Dos Hermanas (37°17'01"N–5°55'20"W) and Aznalcázar (37°18'14"N–6°15'03"W), Seville (Spain). Early morning hedgehogs killed on roads at night were located and collected by hand. Collected hedgehogs were taken to the laboratory and then placed on a white sheet of paper in order to be visually examined for ectoparasites. Fleas were collected by adding 70% ethanol and then were removed from the hedgehogs by gently shaking the animal over the white sheet of paper. Fleas from hedgehog from Corse were obtained through the assistance of colleagues (see Acknowledgements). Fleas obtained were kept in Eppendorf tubes with 70% ethanol until required for subsequent identification and sequencing; for details on locality, host, flea species and gender, see table 1.

Morphological identification and biometrical study

Flea specimens collected from Spain were classified by us whereas those fleas from Corse provided by our colleagues were classified firstly by them (see Acknowledgements) and then compared morphologically with our specimens in our laboratory. For morphological analysis, all specimens were examined and photographed under an optical microscope. Posteriorly, flea legs were cut off in order to carry out the DNA extraction, while the rest of the flea was used to confirm *A. erinacei* species/subspecies morphological identity. Thus, they were cleared with 10% KOH, prepared and mounted on glass slides using conventional procedures (Lewis, 1993). Once mounted, they were examined and photographed again for a deeper morphological analysis using a Nikon microscope equipped with a camera lucid system and a photomicroscope. Generic, specific and subspecific identification was carried out according to Jordan & Rothschild (1912),

Table 1. GenBank accession numbers of ITS1, ITS2 and *cytb*, *cox1* and partial 18S gene sequences of individuals of *A. erinacei* and *X. cheopis* obtained in this study.

Location/Country/Sample numbers	Species/Gender	Female population	Host	Number of fleas	Base pairs (bp)	Accession number
ITS1						
Seville/Spain/AE5-11, AE13, AE14-15	<i>A. erinacei</i> /7♂ 3♀	A, B, and C	<i>E. europaeus</i>	10	949	LT604112
Seville/Spain/AE12	<i>A. erinacei</i> /1♀	A	<i>E. europaeus</i>	1	950	LT604113
Corse/France/AE17, AE19	<i>A. erinacei</i> /2♂	–	<i>E. europaeus</i>	2	951	LT703437
Corse/France/AE18, AE20-21	<i>A. erinacei</i> /3♀	A and B	<i>E. europaeus</i>	3	951	LT627351
ITS2						
Seville/Spain/AE5-7, AE9-16	<i>A. erinacei</i> /6♂ 5♀	A, B, and C	<i>E. europaeus</i>	11	361	LT604114
Seville/Spain (clone 1)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	361	LT745879
Seville/Spain (clone 2, 3, 5, 7 and 8)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	361	LT745878
Seville/Spain (clone 4)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	361	LT745880
Seville/Spain (clone 6)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	361	LT745881
Corse/France/AE17, AE19	<i>A. erinacei</i> /2♂	–	<i>E. europaeus</i>	2	360	LT703438
Corse/France/AE18, AE20-21	<i>A. erinacei</i> /3♀	C and D	<i>E. europaeus</i>	3	360	LT627352
Corse/France (clone 1, 2, 4 and 7)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	360	LT745882
Corse/France (clone 3)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	360	LT745883
Corse/France (clone 5)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	360	LT745884
Corse/France (clone 6)	<i>A. erinacei</i>	–	<i>E. europaeus</i>	–	360	LT745885
El Hierro/Spain/XC1, XC7	<i>X. cheopis</i> /1♂ 1♀	–	<i>R. rattus</i>	2	358	LT604121
18S						
Seville/Spain/AE5, AE7-8, AE11-12, AE14	<i>A. erinacei</i> /3♂ 3♀	A and B	<i>E. europaeus</i>	6	1160	LT604111
Corse/France/AE17, AE19	<i>A. erinacei</i> /2♂	–	<i>E. europaeus</i>	2	1160	LT703442
Corse/France/AE18, AE20-21	<i>A. erinacei</i> /3♀	A and B	<i>E. europaeus</i>	3	1160	LT627347
<i>cox1</i>						
Seville/Spain/AE5, AE6	<i>A. erinacei</i> /2♂	–	<i>E. europaeus</i>	2	658	LT604115
Seville/Spain/AE9-13, AE14-16	<i>A. erinacei</i> /4♂ 4♀	A and C	<i>E. europaeus</i>	8	658	LT604116
Corse/France/AE17	<i>A. erinacei</i> /1♂	–	<i>E. europaeus</i>	1	658	LT703439
Corse/France/AE19	<i>A. erinacei</i> /1♂	–	<i>E. europaeus</i>	1	658	LT703440
Corse/France/AE18	<i>A. erinacei</i> /1♀	A	<i>E. europaeus</i>	1	658	LT627348
Corse/France/AE20, AE21	<i>A. erinacei</i> /2♀	B	<i>E. europaeus</i>	2	658	LT627349
<i>cytb</i>						
Seville/Spain/AE5, AE6, AE9, AE10, AE12	<i>A. erinacei</i> /4♂ 1♀	B	<i>E. europaeus</i>	5	374	LT604120
Seville/Spain/AE7	<i>A. erinacei</i> /1♀	B	<i>E. europaeus</i>	1	374	LT604117
Seville/Spain/AE8	<i>A. erinacei</i> /1♂	–	<i>E. europaeus</i>	1	374	LT604118
Seville/Spain/AE11, AE13-16	<i>A. erinacei</i> /2♂ 3♀	A, B and C	<i>E. europaeus</i>	5	374	LT604119
Corse/France/AE17, AE19	<i>A. erinacei</i> /2♂	–	<i>E. europaeus</i>	2	374	LT703441
Corse/France/AE18, AE20-21	<i>A. erinacei</i> /3♀	A and B	<i>E. europaeus</i>	3	374	LT627350
El Hierro/Spain/XC1, XC7	<i>X. cheopis</i> /1♂ 1♀	–	<i>R. rattus</i>	2	374	LT604122

Hopkings & Rothschild (1953) and Beaucournu & Launay (1990). Thus, the morphological characteristics considered for the specific determination include:

- Presence of a well noticed sclerotized falx of head.
- Asymmetrical antenna with partially welded basal segments.
- Presence of a pleural rod of mesothorax.
- Vestigial genal and pronotal comb. Genal comb composed of one to three spines, these being the small posterior ones. Pronotal comb composed of at most six spines on the two sides together, and sometimes only one each side. Very rarely some of these combs are entirely absent, but it can occur.
- Hind tibia with six seta-bearing notches along dorsal margin with a row of six to eleven little setae near to dorsal margin.

For the subspecific differentiation, we considered morphological characteristics reported by Jordan & Rothschild (1912), Hopkings & Rothschild (1953) and Beaucournu & Launay (1990):

- Male specimens of *A. e. erinacei* showed the greatest length of basimere same as distance from base of spine on genal process to anterior edge of eye while, male individuals of *A. e. maura* showed the greatest length of basimere same as distance from base of spine at tip of genal process to front margin on head.
- Females of *A. e. erinacei* showed eighth abdominal tergum bearing two lateral bristles towards the base and seventh sternum usually with five lateral bristles on the two sides together, whereas *A. e. maura* females presented only one bristle in eighth abdominal tergum and seventh sternum usually bore four lateral bristles on the two sides together.

Furthermore, 20 different parameters were measured of 48 (23 females and 25 males) *A. erinacei* specimens (table 2). Descriptive univariate statistics (arithmetic means, standard deviations, and variation coefficients) for all parameters were determined for two populations (*A. erinacei* from Seville and *A. erinacei* from Corse) using IBM® SPSS® Statistics program version 24.0.0.0 (Pardo & Ruiz, 2002). In addition, a two-way Analysis of Variance (ANOVA), with a factorial design, was used in order to test the significance of the differences between geographic origin (GO) and sex. Different individuals of each population corresponding with the number of replications were considered for each combination of sex and GO. Means were compared using the Fisher's Least Significant Difference (LSD). The effect of GO, sex (S) and the interaction (GO × S) were calculated as the fraction of the total variability explained. All data analysis was performed with the software 'Statistix 9.0'. Statistically significant differences were assumed for $P < 0.05$ (*).

Molecular study

The DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) extracted total DNA from flea legs according to the manufacturer's protocol. Then, genomic DNA was checked using an electrophoresis in 0.8% agarose gel electrophoresis infused with ethidium bromide.

All molecular markers sequenced in this study were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a thermal cycler (Eppendorf AG). PCR mix, PCR conditions, and PCR primers are summarized in table S1. The 18S, ITS1, ITS2, partial *cox1*, and *cytb* gene sequences obtained from *A. erinacei*

from the two geographical areas were deposited in GenBank database (table 1). Furthermore, we sequenced and provided ITS2 and *cytb* sequences of *Xenopsylla cheopis* isolated from *Rattus* sp. from El Hierro Island (Spain) (see table 1).

The PCR products were checked on ethidium bromide stained 2% Tris–Borate–EDTA (TBE) agarose gels. Bands were eluted and purified from the agarose gel by using the QWizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega). Once purified, the products were sequenced by Stab Vida (Portugal). To obtain a nucleotide sequence alignment, we used MUSCLE alignment method (Edgar, 2004) by the MEGA program version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). The rDNA intra-individual variation was determined by sequencing 7–8 clones of one individual. The PCR products were eluted from the agarose gel using the WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and the transformation was carried out as cited by Cutillas *et al.* (2009). Plasmids were purified using a Wizard Plus SV (Promega) and sequenced by Stab Vida (Portugal) with a universal primer (M13).

A restriction map of the ITS1 and ITS2 sequences of *A. erinacei* from Seville and Corse was constructed using The Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000; available at http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html). For determination of PCR-linked random-fragment-length polymorphism (RFLP), ITS1 and ITS2 PCR products from *A. erinacei* were restricted directly with 2.5 endonuclease units and were incubated 3 h at 37°C. Digests were separated on 2% agarose-TBE gels.

In order to assess the similarity among all sequences of *A. erinacei* obtained in this study, we analyzed the number of base differences per sequence among all of them using number of differences method of MEGA 5 program version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Furthermore, we complemented these analyses with other Pulicidae species sequences obtained from GenBank. On the other hand, similarity sequence divergence of *cox1* sequences were calculated using the Kimura 2 parameter (K2P) distance model in order to apply the 10X rule (Hebert *et al.*, 2003) and to figure out the threshold level of nucleotide divergence to represent different categories of 'species' used by Hebert *et al.* (2003). This method was included in MEGA program version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

Phylogenetic trees were inferred using nucleotide data and performed using two methods: Maximum Likelihood (ML) trees were generated using the PHYML package from Guindon & Gascuel (2003) whereas Bayesian inferences (B) were generated using MrBayes-3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). JMODELTEST (Posada, 2008) program was used to determinate the best-fit substitution model for the parasite data (18S, ITS1, ITS2, *cox1*, and *cytb*). Models of evolution were chosen for subsequent analyses according to the Akaike Information Criterion (Huelsenbeck & Rannala, 1997; Posada & Buckley, 2004). For the study of the dataset containing the concatenation of four markers (18S, ITS2, *cox1*, *cytb*), analyses based on BI were partitioned by gene and models for individual genes within partitions were those selected by jModeltest. For ML inference, best-fit nucleotide substitution models included general time-reversible model with gamma-distributed rate variation and a proportion of invariable sites, GTR+I+G (ITS2, *cox1*), transition model with gamma-distributed rate variation, TIM+G (*cytb*) and general time-reversible model with gamma-distributed rate variation GTR+G (18S and ITS1). Support for the topology was examined using bootstrapping (heuristic option) (Felsenstein, 1985) over 1000 replications to assess the relative reliability of clades.

Table 2. Biometrical data of *A. erinacei* specimens collected from hedgehogs from Seville and Corse.

	<i>A. erinacei</i> from Seville (Spain)					<i>A. erinacei</i> from Corse (France)					ANOVA TEST		
	MIN	MAX	X	σ	VC	MIN	MAX	X	σ	VC	VCT %	S.D.L 95%.	SV
TLF (mm)	2.1	2.9	2.5	0.3	12	1.8	2.6	2.2	0.6	27	13.84	581	
TLM (mm)	1.8	2.2	1.9	0.2	11	2.0	2.3	2.1	0.2	5	6.88	157.05	*
TWF (mm)	1.0	1.4	1.2	0.1	8	0.8	1.2	1	0.3	30	13.41	267.43	
TWM (mm)	0.8	1.1	0.9	0.1	11	0.9	1	1	0.1	10	7.42	79.92	
HLF (μm)	426	592	500	42	8	410	456	433	32	7	8.41	69.72	
HLM (μm)	426	486	448	24	5	456	501	479	19	4	4.76	24.94	*
HWF (μm)	304	410	365	29	8	289	334	311	32	10	8.18	49.34	*
HWM (μm)	273	365	334	30	9	304	357	338	19	6	7.79	29.78	
BL (μm)	328	410	362	25	7	263	275	269	5	2	6.11	22.63	*
BW (μm)	117	164	159	14	9	123	147	135	13	10	9.47	15.58	*
GHL (μm)	363	440	393	22	6	–	–	–	–	–	–	–	
GEL (μm)	–	–	–	–	–	252	298	280	17	6	–	–	
EL (μm)	129	199	156	20	13	100	117	109	12	11	13.30	34.0	*
EW (μm)	70	188	128	29	23	76	94	85	13	15	23.07	48.21	
PL (μm)	47	105	73	15	20	41	76	67	12	18	23.37	27.83	
DS7 (μm)	23	76	39	17	44	29	35	32	4	13	42.67	29.01	
DSS (μm)	234	398	285	57	20	264	270	267	4	16	20.09	148.54	
PROLF (μm)	117	205	152	31.51	20.8	105	188	146	41.50	39.9	23.06	61.15	
PROLM (μm)	100	169	140	20.80	14.8	129	182	150	19.63	14.9	14.88	24.55	
MESLF (μm)	117	205	158	24.94	16.4	129	193	161	32	27.9	17.92	48.10	
MESLM (μm)	70	164	119	23.63	21.10	105	158	135	16.54	13.3	18.00	25.79	
METLF (μm)	117	176	152	15.96	10.9	147	176	161	14.50	12.7	11.11	28.97	
METLM (μm)	105	135	127	8.83	10.9	135	164	147	10.76	7.9	7.65	11.8	*

TLF, total female length; TLM, total male length; TWF, total female width; TWM, total male width; HLF, total length of the female head; HLM, total length of the male head; HWF, total width of the female head; HWM, total width of the male head; BL, total length of the basimere; BW, total width of the basimere; GHL, Distance from base of spine at tip of genal process to front margin on head; GEL, distance from base of spine on genal process to anterior edge of eye; EL, total length of the spermatheca; EW, total width of the spermathecal; PL, total length of falx; DS7, distance among setae of seventh sternum; DSS, distance between more posterior setae of eighth abdominal tergum and posterior margin of the abdomen; PROLF, total male length of the prothorax; PROLM, total female length of the prothorax; MESLF, total male length of the mesothorax; MESLM, total female length of the mesothorax; METLM, total male length of the metathorax; METLF, total female length of the metathorax; MAX, maximum; MIN, minimum; σ, standard deviation; X, arithmetic mean; VC, variation coefficient (%). ANOVA TEST: Fisher's Least Significant Difference (LSD) and coefficient of variation (CV (%)) for each parameter.

*Mean significant differences ($P < 0.05$) according to LSD test.

The commands used in MrBayes-3.2.6 for BI were $nst = 6$ with invgamma rates (ITS2 and *cox1*), $nst = 2$ with gamma rates (*cytb*) and $nst = 6$ with gamma rates (18S and ITS1). For BI, the standard deviation of split frequencies was used to assess if the number of generations completed was sufficient; the chain was sampled every 500 generations and each dataset was run for 10 million generations. Adequacy of sampling and run convergence was assessed using the effective sample size diagnostic in TRACER program version 1.6 (Rambaut & Drummond, 2007). Trees from the first million generations were discarded based on an assessment of convergence. Burn-in was determined empirically by examination of the log likelihood values of the chains. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) was percentage converted.

The phylogenetic analyses, based on 18S rRNA, ITS1, ITS2, *cox1* and *cytb* mtDNA sequences were carried out using our sequences and those obtained from GenBank database (Appendix 1). Phylogenetic trees based on 18S rRNA, ITS2, *cox1*, *cytb* mtDNA and concatenated (18S, ITS2, *cox1*, and *cytb*) sequences were rooted including outgroup species representing members of the Order Mecoptera: *Panorpa meridionalis*. This choice was based on the combination of morphological and molecular data obtained in former studies which provided compelling evidence for a sister group relationship between Mecoptera and Siphonaptera (Whiting, 2002; Whiting et al., 2008). The ITS1 sequence of *Panorpa meridionalis* or other species of Mecoptera was not available neither by

amplification of different individuals nor in any public database. Thus, phylogenetic tree with other Siphonaptera species based on ITS1 sequences were constructed using different outgroup species representing members of Order Diptera: *Anopheles moucheti nigerensis* and *Anopheles moucheti bervoetsi*. Thus, ITS1 was discarded for the concatenated dataset. The selection of flea taxa for the concatenated phylogenetic tree was limited to flea species whose 18S, ITS2, *cox1*, and *cytb* sequences were available on GenBank database.

Results

Morphological and biometrical results

In total 48 fleas: 13 fleas from two hedgehogs (*E. europaeus*) and 35 fleas from three hedgehogs (*E. europaeus*) were collected from Corse and Seville, respectively.

Specific morphological identification done by ourselves was in agreement with that made by our colleagues. Thus, all specimens isolated in this work showed specific morphological characteristics of *A. erinacei* (fig. 1a–f). Within this species, males of *A. erinacei* from Corse presented typical morphological characteristics of *A. e. erinacei* (See material and methods) (fig. 1g), while those from Seville presented typical morphological characteristics of *A. e. maura* (See material and methods) (fig. 1h) (table S2). Furthermore, total length and total width of the basimere appeared as a

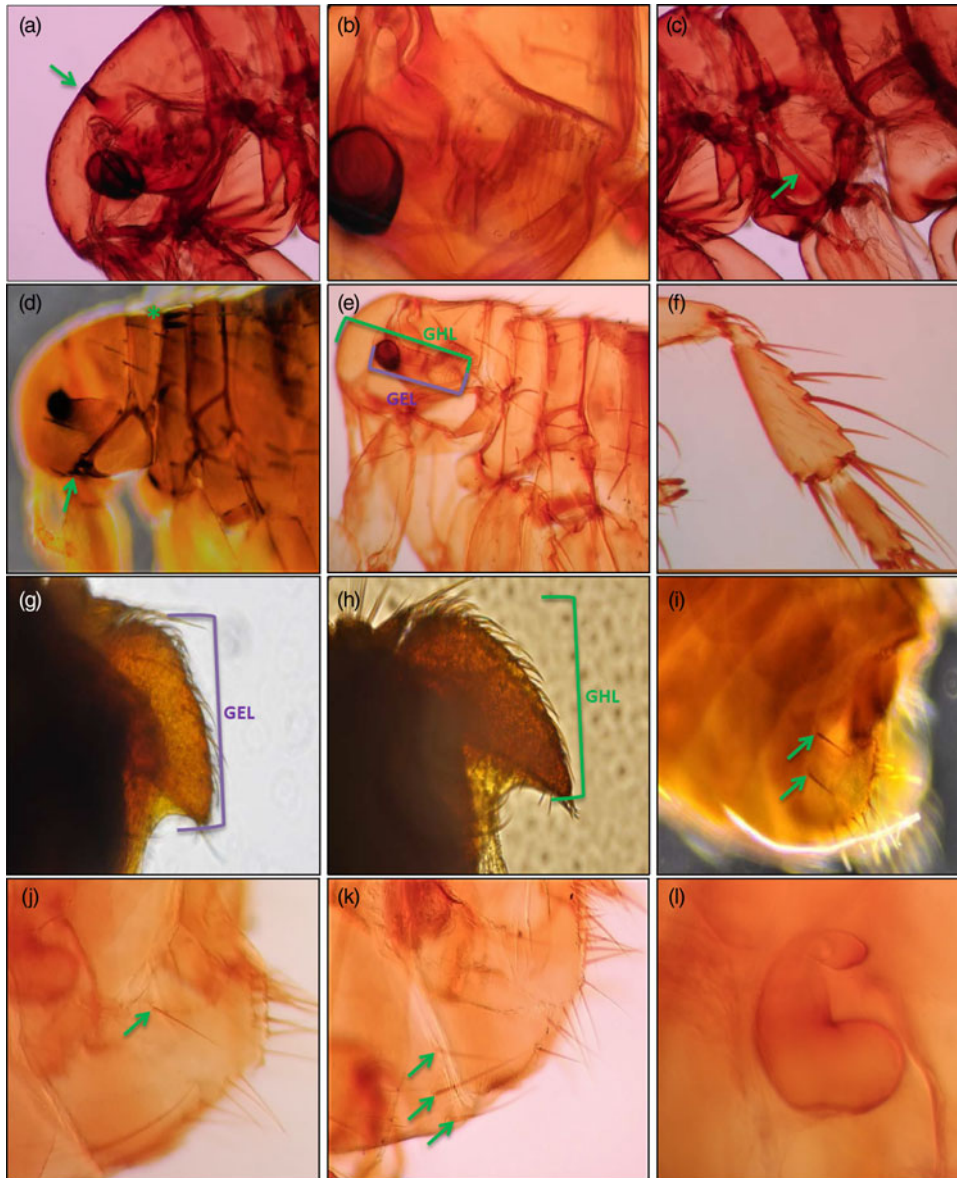


Fig. 1. Morphological specific and subspecific characteristics of *Archaeopsylla erinacei* and their subspecies: *A. e. erinacei* (Bouché, 1835) and *A. e. maura*. (a) Falx of head (arrowed); (b) Asymmetrical antenna with partially welded basal segments; (c) Pleural rod of mesothorax (arrowed) (d) Vestigial genal (arrowed) and pronotal (asterisk) combs; (e) *A. erinacei* without pronotal comb, GHL: distance from base of spine at tip of genal process to front margin on head, GEL: distance from base of spine on genal process to anterior edge of eye; (f) Hind tibia of *A. erinacei*; (g) Male basimere of *A. e. erinacei*; (h) Male basimere of *A. e. maura*; (i) Female of *A. erinacei* eighth tergum bearing two lateral bristles (arrowed); (j) Female of *A. erinacei* eighth tergum bearing only one lateral bristle (arrowed); (k) Female of *A. erinacei* seventh sternum with three lateral bristles (each side) (arrowed); (l) Spermatheca of *A. erinacei*.

significant value to differentiate males from both geographical regions.

On the other hand, according to previous morphological descriptions of different authors (See material and methods), we found three different operational taxonomic units (OTUs) of *A. erinacei* females:

- Population A: *A. erinacei* females which showed morphological characteristics of *A. e. erinacei* (See material and methods) (fig. 1i). This population was observed on hedgehogs from Corse and Seville (table S2).
- Population B: *A. erinacei* females which showed eighth abdominal tergum bearing only one lateral bristle towards the base (fig. 1j) and seventh sternum bore five lateral bristles on the two sides together (two and three bristles each side). This population could not be classified either *A. e. erinacei* or *A. e. maura* since it showed ambiguous morphological characteristics. This population was observed on hedgehogs from Corse and Seville (table S2).
- Population C: *A. erinacei* females which showed eighth abdominal tergum bearing only one lateral bristle towards the base (fig. 1j) and seventh sternum bore six lateral bristles on

the two sides together (three bristles each side) (fig. 1k). This population could neither be classified *A. e. erinacei* nor *A. e. maura* since it showed ambiguous morphological characteristics. This population was only observed on hedgehogs from Seville (table S2).

Biometrical data (table 2) showed that total width, total length of the head, total width of the head, and the total length of spermatheca (fig. 1l) in females, showed significant values to differentiate females from both geographical regions. Thus, the length of spermatheca was considerably higher in females from Seville than that in females collected from Corse, regardless which OTU they belong.

Mean values of all the morphological traits are showed in table 2. Thus, ANOVA showed several significant differences ($P < 0.05$) between *A. erinacei* (females and males) from Seville and Corse. With respect to females, total width of the female head (HWF) and total length of the spermatheca (EL) showed significant differences, corresponding with the highest values to females from Seville. On the other hand, males showed significant differences ($P < 0.05$) in total male length (TLM), total length of the male head (HLM), total length of the basimere (BL), total width of the basimere (BW) and total male length of the metathorax (METLM). Thus, males of *A. e. maura* from Seville presented higher mean of BL and BW than those from Corse and, by contrast, males from Corse presented higher mean of TLM, HLM and METLM than those from Seville (Spain).

Molecular results

Partial 18S rRNA gene analysis

Partial 18S rRNA gene sequences of different populations of *A. erinacei* were 1160 base pairs (bp) in length (table 1). No differences were observed between partial 18S rRNA gene sequences from both geographical origins. Partial 18S gene phylogenetic tree showed species belonging to Pulicidae family clustered together, with high bootstrap and Bayesian Posterior Probabilities (BPP) values, but phylogenetically distant from Stenoponiidae, Ctenophthamidae, and Ceratophyllidae (tree not shown). Nevertheless, this tree was unable to differentiate at species and subspecies level.

ITS1 and ITS2 analysis

The length of the ITS1 sequences of *A. erinacei* ranged from 949–950 (Seville) to 951 (Corse) (table 1). On the other hand, ITS2 sequence length ranged from 360 (Corse) to 361 (Seville). This length difference was also observed in clones from individuals from two different geographical origins and was due to the existence of one extra basis pair in position 258 in the ITS2 sequence of the individuals from Seville.

ITS2 intra-individual similarity studied in seven clones of one individual of *A. erinacei* from Corse ranged from 99.4 to 100%, whereas this value ranged from 99.2 to 100% when eight clones of one individual of *A. erinacei* from Seville were compared. Specimens obtained from the same geographical area showed the same ITS2 sequence (Intra-population similarity = 100%), indistinctly if they belong to different morphological populations (females). Unlike this value, when the ITS2 sequences of individuals from both geographical origins (Corse and Seville) were compared, the similarity observed was 96.9% (Intra-specific similarity = 96.9%).

ITS1 sequences of specimens from the same geographical origin were identical (Intra-population similarity = 100%).

On the other hand, when the ITS1 sequences from both geographical origins were compared, the similarity observed was 99.1% (Intra-specific similarity = 99.1%).

Based on ITS1 and ITS2 sequences, restriction mapping identified endonucleases delineating the two different geographical areas (Corse and Seville) (fig. 2). Thus, *EcoRV*, *HaeIII*, and *PhoI* presented one restriction site in ITS1 sequences of *A. e. erinacei* (male) from Seville but none in *A. e. maura* (male) from Corse (fig. 2). Restriction mapping for ITS2 sequences showed *AseI*, *MseI* (Position 78) and *VspI* presented one restriction site in *A. e. erinacei* (male) from Corse but none in *A. e. maura* (male) from Seville, whereas, *AsuII*, *BbuI*, *DraI*, *NlaIII*, *PsiI*, *MseI* (Position 179) and *SphI* presented one restriction site in ITS2 sequences of *A. e. maura* from Seville but none in *A. e. erinacei* from Corse (fig. 2). The endonuclease *HaeIII* was chosen for the use in the PCR-linked RFLP analysis of ITS1. As predicted by the sequence data, restriction of ITS1 PCR products of *A. erinacei* from two geographical origins with *HaeIII* produced two restriction fragments (194 and 755 bp) for individuals from Seville and an undigested product (951 bp) for individuals from Corse (fig. 3).

The phylogenetic tree inferred from ITS2 sequences of *A. erinacei* and other ITS2 sequences retrieved from GenBank (see Appendix 1) showed all Pulicidae species clustered together with high bootstrap and BPP values and phylogenetically close to Stenoponiidae family (fig. S1). Within Pulicidae clade, *A. erinacei* specimens comprised a well-supported subclade phylogenetically related to the remaining Pulicidae species. This subclade showed individuals separated according to geographical origin with high bootstrap and BPP values, indistinctly these individuals belong to different morphological populations (fig. S1).

ITS1 phylogenetic tree revealed a subclade clustering all *A. erinacei* specimens related to *Ctenocephalides* within Pulicidae family clade. Furthermore, likewise in ITS2 phylogenetic tree, *A. erinacei* individuals clustered separated according to geographical origin with high bootstrap and BPP values (fig. S2).

Partial *cox1* and *cytb* mtDNA gene analysis

The partial *cox1* mtDNA gene sequences of *A. erinacei* from the two geographical areas were 658 bp in length (table 1). Intra-population similarity observed ranged from 99.8 to 100% in both geographical origins, while intra-specific similarity ranged from 97.7 to 98.1% (table 3). Furthermore, the conspecific divergence ranged from 0 to 0.2. If we consider that the average of conspecific divergence was 0.09, we can apply the 10X rule; thus, the threshold level of nucleotide divergence between two *Archaeopsylla* species would be 0.9%. Nevertheless, any value of conspecific divergence among all individuals analyzed in this study overcame this threshold.

On the other hand, the length of the partial *cytb* mtDNA gene sequences of *A. erinacei* from Corse and Seville was 374 bp (table 1). Intra-population similarity of *A. erinacei* specimens from Seville ranged from 98.1 to 100%, while this value was 100% for specimens collected from Corse. Intra-specific similarity ranged from 98.1 to 98.9% (table 4). Furthermore, inter-specific *cytb* similarity observed between others congeneric species belonging to Pulicidae family showed quite lowest percentage values than those observed between *A. erinacei* specimens from the two different geographical origins analyzed in this work (table 4).

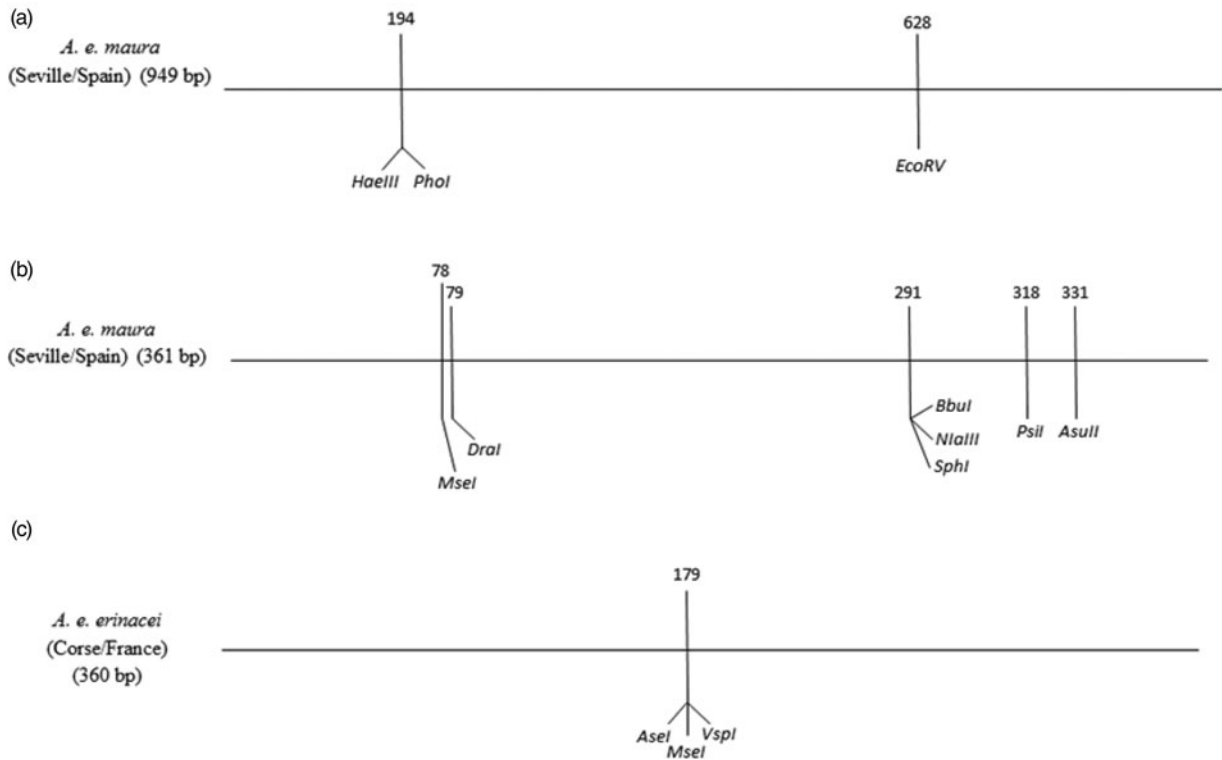


Fig. 2. (a) Schematic representation of restriction maps of the ITS1 sequence of *A. e. maura* collected from Seville. (b) Schematic representation of restriction maps of the ITS2 sequence of *A. e. maura* collected from Seville. (c) Schematic representation of restriction maps of the ITS2 sequence of *A. e. erinacei* collected from Corse.

Phylogenetic tree topology of both mitochondrial markers revealed a highly supported clade clustering all Pulicidae species (figs S3 and S4). In addition, *A. erinacei* individuals from Seville clustered together with high bootstrap and BPP values and separated from *A. erinacei* specimens collected from Corse distinctly if these individuals belong to different morphological populations (figs S3 and S4). Particularly, in *cox1* phylogenetic tree, *Ctenocephalides* species appeared clustering near to *Archaeopsylla* with high bootstrap and BPP values (96/82), whereas in *cytb* phylogenetic tree, *Ctenocephalides* species and the others Pulicidae species clustered in polytomy in relation to *Archaeopsylla*.

The concatenated dataset of the partial 18S gene, ITS2, partial *cytb*, and *cox1* gene sequences included 2558 aligned sites and 30 taxa, including outgroups. Phylogenetic analyses of the concatenated dataset yielded a tree with branches strongly supported (fig. 4). The analysis based on the concatenated dataset is concordant with all trees constructed on the basis of the single markers. Thus, all species belonging to Pulicidae family clustered together in two main subclades with high bootstrap and BPP support. The first one clustered all *Ctenocephalides* species, while in the second one all *Archaeopsylla* species clustered separated according to two different geographical origins: Corse and Seville (fig. 4).

Discussion

It has been widely reported the idea that majority of characters used for flea species and subspecies diagnoses are based

on the shape and structure of their extraordinarily complex genitalia, or the presence and distribution of setae and spines (Traub & Starcke, 1980; Dunnet & Mardon, 1991). While these characters are adequate for species diagnoses, they are mostly autapomorphic at the species and subspecies level and of limited utility for phylogenetic reconstruction. Thus, Siphonaptera appears to have many instances of parallel reductions and modifications, probably associated with multiple invasions of similar hosts, which may obscure homology. In addition, from a phylogenetic standpoint, Siphonaptera has remained as the most neglected of the holometabolous insect orders (Whiting *et al.*, 2008).

The present work represents the first study that provides morphological, biometrical, molecular and phylogenetic comparative data of *A. erinacei* and their subspecies: *A. e. erinacei* and *A. e. maura*, in order to assess taxonomic and phylogenetic relationships between both subspecies and to shed light on the systematics of *A. erinacei*, representing a new tool to elucidate identification within the genus.

From a morphological standpoint, Jordan & Rothschild (1953) were the first authors who provided some morphological features in order to identify and discriminate between both subspecies. They based the male morphological identification on the length of basimere, whereas female morphological subspecies discrimination was based on the presence of one or two lateral bristles in eighth abdominal tergum and the presence of four or five lateral bristles in seventh abdominal sternum on the two sides together. Beaucournu & Launay (1990) accepted these morphological criteria in order

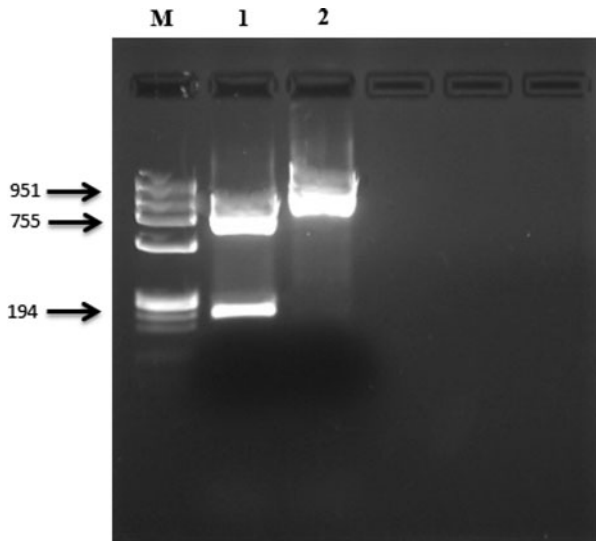


Fig. 3. PCR-RFLP analysis of the ITS1 of *A. erinacei* collected from different geographical origins using *HaeIII* endonuclease. M = DNA Molecular Weight Marker IX (72–1353 bp); Line 1 = *A. e. erinacei* from Seville; Line 2 = *A. e. maura* from Corse.

to discriminate both subspecies, excluding the setae number observed in the seventh abdominal sternum. Nevertheless, these authors pointed out the high taxonomic similarity between these two subspecies and they observed that only male specimens could be identified easily each other. Our results reinforce the idea of the use of the length of basimere as a useful morphological criterion in order to discriminate between males of *A. e. maura* and *A. e. erinacei*. Thus, based on these criteria we conclude that males collected from Corse belong to *A. e. erinacei*, while male specimens collected from Seville belong to *A. e. maura*.

Unlike male individuals, our results showed that previous criteria used for morphological differentiation in females of *A. erinacei* were not useful to discriminate between both subspecies. Thus, we observed different morphological populations of females showing overlapped morphological characters that not corresponded with any previous subspecific morphological characterization cited by different authors. Furthermore, a geographical pattern of distribution was not observed in female specimens, appearing *A. e. erinacei* (population A) and population B in both geographical areas. With these results, two different hypotheses could be suggested. The first one would consider that *A. e. erinacei* occurs in both geographical areas and the appearance of population B and C just mean morphological variants belonging to a polymorphic taxon. The other one could be considering that the morphological classification of females does not support the male one, therefore, it could be suggested to discriminate between both subspecies based exclusively on the morphological characteristics of the male specimens unless new discriminative morphological characters were revealed for female subspecific classification. In this sense, we observed, by the first time, that the total length of the spermatheca could be a useful criterion in order to discriminate between both females' subspecies since this criterion display a geographical pattern of distribution corroborated by molecular and phylogenetic data. Thus, we could conclude that individuals from Seville showing a total length of spermatheca higher than 120 μm corresponded

with *A. e. maura* while those from Corse showing a total length of spermatheca lower than 120 μm corresponded with *A. e. erinacei*. Furthermore, length of spermatheca appeared as a significant value calculated by ANOVA test to differentiate both subspecies. Nevertheless, we assumed that future research based on the study of populations of *A. erinacei* from different geographical areas could consolidate and support the taxonomic status of this species.

The analysis of external morphological characters presents some weaknesses when are used as the unique criterion to distinguish female specimens of this species. Thus, the use of molecular biology is considered as an essential tool in order to clarify morphological data.

These facts, lead us to suggest that *A. erinacei* subspecies might have been morphologically misidentified for many years in Mediterranean area. This observation could be the consequence of a wrong identification practice of females based on morphological differences of male specimens or the GO as a valid criterion for the identification between both subspecies. Lewis (1967) and Beaucournu & Launay (1990) argued that certain flea subspecies admitted by some authors could just be a morphological variant belonging to a polymorphic taxon. This fact is corroborated by phylogenetic analyses in our study, in which we did not find correspondence between female morphological differences analyzed and the 18S, ITS1, ITS2, *cox1*, and *cytb* sequences.

According to ITS's analyses, ITS2 sequences of both subspecies were markedly shorter than ITS1 sequences. Vobis *et al.* (2004) and Zurita *et al.* (2015, 2016, 2018) have previously reported this fact in other species of fleas such as *C. felis*, *Stenoponia tripectinata tripectinata*, *C. canis*, *N. barbarus*, and *N. fasciatus*.

Both markers (ITS1 and ITS2) did not show sequence differences among individuals from the same geographical area regardless they belong to different morphological populations (females). Nevertheless, they showed different percentage of similarity ranged from 96.9% (ITS2) to 99.1% (ITS1) between specimens from two geographical regions each other. Thus, these nuclear markers were useful to differentiate *A. erinacei* from Seville and Corse. Marrugal *et al.* (2013) reported similar values of similarity and Zurita *et al.* (2016), who reported an inter-specific similarity ranged from 91.8 to 96% between ITS sequences of *C. felis* and *C. canis* isolated from dogs from different geographical areas. These geographical signals in fleas have previously been reported by Luchetti *et al.* (2007), who noticed the presence of two genotypic groups (Pacific and Atlantic) based on the analysis of ITS2 sequences of *Tunga penetrans* from Ecuador, Brazil and different geographical areas of Africa. In addition, several specific recognition sites for endonucleases were detected in ITS1 and ITS2 sequences in order to differentiate two geographical lineages. Thus, *EcoRV*, *HaeIII*, *PhoI*, *AseI*, *VspI*, *AsuII*, *BbuI*, *DraI*, *NlaIII*, *MseI*, *PsiI*, and *SphI* sites have diagnostic value for specific determination of subspecific discrimination in *A. erinacei*.

The partial *cox1* and *cytb* mtDNA gene sequences showed the same geographical pattern than ITS sequences analyses (tables 3 and 4) regardless which morphological population they belong to. On the other hand, *cox1*, *cytb*, and concatenated phylogenetic trees reinforce the idea of the existence of two geographical genetic lineages in *A. erinacei* (Iberian Peninsula and Corse Island). Furthermore, *cox1* phylogenetic tree showed specimens belong to *Ctenocephalides* and *Archaeopsylla* genera clustered together. Zhu *et al.* (2015) who included both genera in Archaeopsyllini subfamily reported

Table 3. Intra-population and intra-specific similarity observed among all the partial *cox1* mtDNA gene sequences of *Archaeopsylla erinacei* from different geographical areas obtained in this work and other Pulicidae species from GenBank database.

COX1	AE/ SEVILLA/ LT604115	AE/ SEVILLA/ LT604116	AE/ CORSE/ LT703439, LT627348	AE/ CORSE/ LT703440, LT627349	<i>A. erinacei</i> erinacei/ KM890990	<i>C. felis</i> / LN827896	<i>C. canis</i> / LN827901	<i>X. cunicularis</i> / KF479238	<i>X. skrjabini</i> / KM890983	<i>S. cuniculi</i> / KF479237	<i>S. girardi</i> / K890952	<i>P. irritans</i> / KF479246	<i>E. gallinacea</i> / JN008921	<i>E. iberica</i> / KF479239
AE/SEVILLA/ LT604115	–													
AE/SEVILLA/ LT604116	99.8	–												
AE/CORSE/LT703439, LT627348	98.0	97.7	–											
AE/CORSE/LT703440, LT627349	98.1	98.0	99.8	–										
<i>A. erinacei</i> erinacei/ KM890990	98.1	98.0	99.8	100	–									
<i>C. felis</i> /LN827896	87.3	87.0	87.5	87.7	87.7	–								
<i>C. canis</i> /LN827901	87.5	87.3	88.0	88.2	88.2	97.7	–							
<i>X. cunicularis</i> /KF479238	85.6	85.6	86.3	86.6	86.6	88.2	87.0	–						
<i>X. skrjabini</i> /KM890983	86.1	86.1	85.9	86.1	86.1	86.1	86.1	89.4	–					
<i>S. cuniculi</i> /KF479237	85.9	85.9	86.6	86.8	86.8	86.3	86.8	85.8	84.7	–				
<i>S. girardi</i> /K890952	85.2	85.2	85.0	85.2	85.2	85.9	86.3	85.0	83.8	84.7	–			
<i>P. irritans</i> /KF479246	85.0	85.0	85.4	85.4	85.4	87.5	88.2	86.8	85.0	85.6	84.7	–		
<i>E. gallinacea</i> /JN008921	88.4	88.4	88.9	89.1	89.1	87.5	87.7	86.6	86.3	86.6	84.7	88.2	–	
<i>E. iberica</i> /KF479239	88.2	88.2	88.9	88.9	88.9	88.4	88.7	87.8	87.5	87.5	85.6	88.7	–	92.6

Values are given in percentages. (AE = *A. erinacei*).

Table 4. Intra-population and intra-specific similarity observed among all the partial *cytb* mtDNA gene sequences of *Archaeopsylla erinacei* from different geographical areas obtained in this work and other Pulicidae species from GenBank database.

CYTB	AE/ SEVILLA/ LT604120	AE/ SEVILLA/ LT604117	AE/ SEVILLA/ LT604118	AE/ SEVILLA/ LT604119	AE/ CORSE/ LT627350, LT703441	<i>A. erinacei</i> erinacei/ KM890725	<i>C. felis</i> / LN897470	<i>C. canis</i> / LN897471	<i>X. cheopis</i> / LT604122	<i>X. skrjabini</i> / KM890718	<i>S. cuniculi</i> / KM890622	<i>S. girardi</i> / KM890686	<i>E. oschanini</i> / KM890719
AE/SEVILLA/LT604120	–												
AE/SEVILLA/LT604117	99.5	–											
AE/SEVILLA/LT604118	98.4	98.9	–										
AE/SEVILLA/LT604119	99.3	99.2	98.1	–									
AE/CORSE/LT627350, LT703441	98.7	98.7	98.1	98.9	–								
<i>A. erinacei</i> erinacei/KM890725	98.7	98.7	98.1	98.9	99.5	–							
<i>C. felis</i> /LN897470	84.5	85.0	86.1	84.8	85.3	85.8	–						
<i>C. canis</i> /LN897471	85.3	85.8	86.9	85.6	86.1	86.4	90.9	–					
<i>X. cheopis</i> /LT604122	79.4	80.0	80.5	79.7	80.0	80.7	81.8	81.0	–				
<i>X. skrjabini</i> /KM890718	81.3	81.8	82.4	81.6	82.4	82.4	84.8	83.4	81.3	–			
<i>S. cuniculi</i> /KM890622	82.4	82.9	83.4	82.6	83.2	83.7	83.4	84.5	80.5	81.8	–		
<i>S. girardi</i> /KM890686	83.2	83.7	84.0	83.4	84.5	84.5	85.3	84.2	80.5	82.9	78.6	–	
<i>E. oschanini</i> /KM890719	84.0	84.0	84.2	84.2	84.8	85.0	83.7	84.0	78.6	83.4	82.4	79.7	–

Values are given in percentages. (AE = *A. erinacei*).

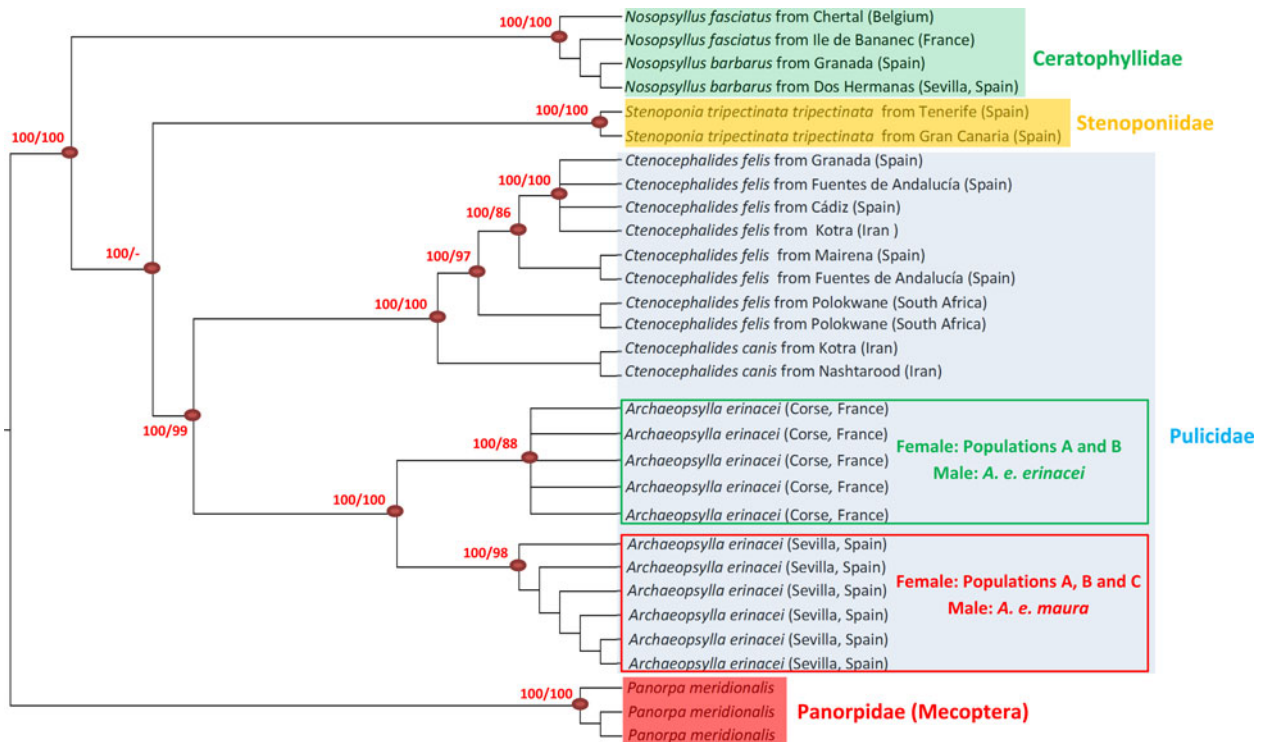


Fig. 4. Phylogenetic tree of *Archaeopsylla erinacei* from different geographical origins (see Table 1) based on concatenated partial 18S ribosomal RNA gene, Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) partial cytochrome c-oxidase 1 (*cox1*) and cytochrome b (*cytb*) gene of mitochondrial DNA inferred using the Bayesian (B) method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown on the branches. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) are percentage converted.

this close phylogenetic relation between *Ctenocephalides* and *Archaeopsylla* genera.

Previous studies showed that fleas have a high level of intraspecific genetic variation (Dittmar & Whiting, 2003; Brinkerhoff *et al.*, 2011). Furthermore, it has been suggested that host specificity may influence the level of intraspecific genetic divergences since more generalist parasite species will show a higher level of intraspecific genetic variation enabling them to infest a broader host range (Van der Mescht *et al.*, 2015). DNA barcoding studies on insects and invertebrates have shown maximum intra-specific variation ranging from 3 to 3.9% (Carew *et al.*, 2007), out of which are markedly higher when specimens of study come from distant geographical regions, especially islands or archipelagos. In this way, Lawrence *et al.* (2014), Zurita *et al.* (2015) and Zurita *et al.* (2018) found a high degree of intra-specific variation in some flea species when populations from islands and mainland were compared, suggesting the existence of different geographical lineages, which could have arisen due to the existence of geographical barriers.

The *cox1* similarity values observed between both geographical genetic lineages (97.7–98.1%) in *A. erinacei* were similar with those observed among different flea species such as *C. felis* and *C. canis* (97.7) (table 3). This fact could suggest that individuals from Spain and Corse could be treated as different species. Nevertheless, based on K2P analysis and 10X rule reported by Hebert *et al.* (2003) we cannot assume that both geographical genetic lineages correspond with two different species within *Archaeopsylla* genus.

Our results are in agreement with Losos & Ricklefs (2009) who suggested that detailed population-level studies can chart the course of evolution over short time periods. This approach can be broadened to incorporate intra-specific level studies with a geographically explicit sampling of individuals for the reconstruction of gene genealogies to reveal the extent to which natural selection or alternative mechanisms may explain evolutionary change. In this sense, island radiations are ideal systems for such an approach, because it is frequently apparent that the arena within which inter-specific diversification has occurred is similar to the arena within which intra-specific diversification is occurring (Ricklefs & Bermingham, 2001).

In conclusion, the present study provides for the first time, comparative morphological, biometrical, and molecular data of *A. erinacei* and their subspecies: *A. e. erinacei* and *A. e. maura*. On the basis of morphological results, we conclude that the number of bristles bearing in eighth abdominal tergum and seventh abdominal sternum of female specimens are not valid criteria as diagnostic characters in order to differentiate *A. e. erinacei* and *A. e. maura*. However, the total length of the spermatheca in females and the different length of basimere in males should be taking into account as characters of reference in order to discriminate between both subspecies.

On the other hand, based on phylogenetic and molecular comparative study of two nuclear markers (ITS1 and ITS2), two mitochondrial markers (*cox1* and *cytb*) and concatenated sequences, we reported the existence of two geographical genetic lineages in *A. erinacei* corresponding with two different

subspecies (*A. e. erinacei* and *A. e. maura*), that could be discriminated by PCR-linked RFLP.

Supplementary material

The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0007485317001274>.

Acknowledgement

The present work was supported by a grant of the V Plan Propio de Investigación of the University of Seville, Spain. The authors thank Dr Carlos Feliu (University of Barcelona) for providing samples from Corse (France).

References

- Beaucournu, J.C. & Gomez-Lopez, M.S. (2015) Orden Siphonaptera. *Revista IDE@ – SEA* **61A**, 1–11.
- Beaucournu, J.C. & Launay, H. (1990) *Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental*. Paris, Faune de France, 76, Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles.
- Bouché, P.F. (1835) Beiträge zur Insektenkunde. II. Bemerkungen über die Gattung *Pulex*. *Nova Acta Physico Medica* **17**, 493–508.
- Brinkerhoff, R.J., Martin, A.P., Jones, R.T. & Collinge, S.K. (2011) Population genetic structure of the prairie dog flea and plague vector, *Oropsylla hirsuta*. *Parasitology* **138**, 71–79.
- Carew, M.E., Pettigrove, V., Cox, R.L. & Hoffmann, A.A. (2007) DNA identification of urban *Tanytarsini* chironomids (Diptera: Chironomidae). *Journal of the North American Benthological Society* **26**, 587–600.
- Cutillas, C., Callejón, R., de Rojas, M., Tewes, B., Ubeda, J.M., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2009) *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica* **111**, 299–307.
- Dittmar, K. & Whiting, M.F. (2003) Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (CytB and CoII). *Journal of Parasitology Research* **91**, 55–59.
- Domínguez, G. (2004) North Spain (Burgos) wild mammals ectoparasites. *Parasite* **11**, 267–272.
- Dunnet, G.M. & Mardon, D.K. (1991) Siphonaptera. pp. 125–140 in Naumann, P.B.C.I.D., Lawrence, J.F., Nielsen, E.S., Spradberry, J.P., Taylor, R.W., Whitten, M.J. & Littlejohn, M.J. (Eds) *Siphonaptera*. Melbourne, CSIRO and Melbourne Univ. Press.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792–1797.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Gamerschlag, S., Mehlhorn, H., Heukelbach, J., Feldmeier, H. & D'Haese, J. (2008) Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). *Parasitology Research* **102**, 193–199.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696–704.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & De Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* **270**, 313–321.
- Hopkins, G.H.E. & Rothschild, M. (1953) *An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History)*. Vol. 1. *Tungidae and Pulicidae*. London, Trustees of the British Museum (Natural History).
- Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**, 227–232.
- Jordan, K. & Rothschild, N.C. (1912) On Siphonaptera collected in Algeria. *Novitates Zoologicae* **19**, 357–372.
- Kaewmongkol, G., Kaewmongkol, S., McInnes, L.M., Burmeij, H., Bennet, M.D., Adams, P.J., Ryan, U., Irwin, P.J. & Fenwick, S.G. (2011) Genetic characterization of flea derived *Bartonella* species from native animals in Australia suggest host-parasite co-evolution. *Infection, Genetics and Evolution* **11**, 1868–1872.
- Kramer, F. & Mencke, N. (2001) *Flea Biology and Control*. Berlin, Heidelberg, New York, Ed. Springer-Verlag, pp. 5–7.
- Krasnov, B.R. (2008) *Functional and Evolutionary Ecology of Fleas: A Model for Ecological Parasitology*. Cambridge, UK, New York, Cambridge University Press.
- Lane, R.P. & Crosskey, R.W. (1993) *Medical Insects and Arachnids*. London, UK, Ed. Chapman & Hall, pp. 529–575.
- Lawrence, A., Hii, S.F., Jirsová, D., Panáková, L., Ionica, A.M., Gilchrist, K., Modrý, D., Mihalca, A., Webb, C.E., Traub, R. J. & Slapeta, J. (2015) Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Veterinary Parasitology* **210**, 215–223.
- Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, M. & Slapeta, J. (2014) High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology* **28**, 330–336.
- Lewis, R.E. (1967) Contributions to a taxonomic revision of the genus *Nosopsyllus* Jordan, 1933. *Journal of Medical Entomology* **4**, 123–142.
- Lewis, R.E. (1993) Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Journal of Medical Entomology* **30**, 239–256.
- Lewis, R.E. (1998) Resume of the Siphonaptera (Insecta) of the world. *Journal of Medical Entomology* **35**, 377–389.
- Linardi, P.M. & Santos, J.L.C. (2012) *Ctenocephalides felis felis* vs *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera:Pulicidae): some issues incorrectly identify these species. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* **4**, 345–354.
- Losos, J.B. & Ricklefs, R.E. (2009) Adaptation and diversification on islands. *Nature* **457**, 830–836.
- Luchetti, A., Trentini, M., Pampiglione, S., Fiorawanti, M.L. & Mantovani, B. (2007) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) and fleas across South America and Africa. *Journal of Parasitology Research* **100**, 593–598.
- Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research* **112**, 2289–2298.
- Medvedev, S., Lobanov, A. & Lyangouzov, I. (2005) World database of fleas (Parhost). Available online at <http://www.zin.ru/Animalia/Siphonaptera>.
- Mehlhorn, H. (2001) *Encyclopaedic References of Parasitology*. Berlin, Springer-Verlag.

- Pardo, A. & Ruiz, M.A.** (2002) *SPSS 11. Guía para el análisis de datos*. Madrid, McGraw-Hill.
- Posada, D.** (2008) Jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253–1256.
- Posada, D. & Buckley, T.R.** (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* **53**, 793–808.
- Rambaut, A. & Drummond, A.** (2007) Tracer v1.6. Available online at <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Ricklefs, R.E. & Bermingham, E.** (2001) Nonequilibrium diversity dynamics of the lesser Antillean avifauna. *Science* **294**, 1522–1524.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** (2003) MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Stothard, P.** (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**, 1102–1104.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S.** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731–2739.
- Traub, R. & Starcke, H.** (1980) *Fleas: Proceedings of the International Conference on Fleas*. Rotterdam, A. A. Balkema.
- Van der Mescht, L., Matthee, S. & Matthee, C.A.** (2015) Comparative phylogeography between two generalist flea species reveal a complex interaction between parasite life history and host vicariance: parasite-host association matters. *BMC Evolutionary Biology* **15**, 105. doi: 10.1186/s12862-015-0389-y.
- Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagburn, B. L., Bond, R., Denholm, I., Dryden, M.W., Payne, P., Rust, M. K., Schroeder, I., Vaughn, M.B. & Bledsoe, D.** (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research* **94**, 219–226.
- Whiting, M.F.** (2002) Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica Scripta* **31**, 93–104.
- Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W. & Dittmar, K.** (2008) A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics* **24**, 677–707.
- Zhu, Q., Hastriter, M.W., Whiting, M.F. & Dittmar, K.** (2015) Fleas (Siphonaptera) are Cretaceous, and evolved with Theria. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **90**, 129–139.
- Zurita, A., Callejón, R., De Rojas, M., Gómez-López, M.S. & Cutillas, C.** (2015) Molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny. *Bulletin of Entomological Research* **104**, 704–711.
- Zurita, A., Callejón, R., De Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C.** (2016) *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*: introgressive hybridization? *Systematic Entomology* **41**, 567–579.
- Zurita, A., Callejón, R., De Rojas, M. & Cutillas, C.** (2018) Morphological and molecular study of the genus *Nosopsyllus* (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *Nosopsyllus barbarus* (Jordan & Rothschild 1912) as a junior synonym of *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc, d’Antic 1800). *Insect Systematic and Evolution* **49**, 81–101.

PLOS ONE

MALDI-TOF MS as a useful tool for rapid identification of flea vectors preserved in alcohol. Detection of flea-associated bacteria by molecular and proteomic methods. --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-18-01602
Article Type:	Research Article
Full Title:	MALDI-TOF MS as a useful tool for rapid identification of flea vectors preserved in alcohol. Detection of flea-associated bacteria by molecular and proteomic methods.
Short Title:	MALDI-TOF MS identification of fleas and molecular identification of flea-borne bacteria
Corresponding Author:	Maureen Laroche IHU Mediterranee Infection Marseille, Bouches du Rhône FRANCE
Keywords:	MALDI-TOF; fleas; Flea-borne diseases; Spain; Rickettsiales; Wolbachia
Abstract:	In the recent years, an increasing number of papers have reported the importance of fleas and human flea-borne infections, especially in relation to wildlife and zoonotic risk. Some of these flea-borne human pathogens have emerged or re-emerged recently such as <i>Bartonella henselae</i> or <i>Rickettsia felis</i> . Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been evaluated in the last years for the identification of multicellular organisms, including arthropods. The goal of the present work was to assess the performance of MALDI-TOF MS for the identification of four fleas species (<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>Pulex irritans</i> , <i>Stenoponia tripectinata</i> and <i>Nosopsyllus fasciatus</i>) stored in ethanol and to detect associated microorganisms from these specimens, collected on Corse, the French Mediterranean Island and the South West of Spain, using MALDI-TOF MS and molecular approaches (qPCR and standard PCR). Our results confirm that MALDI-TOF MS could be used for identification of fleas preserved in alcohol in addition to differentiate flea species infected or not by <i>Bartonella</i> spp. without the use of a molecular method requiring DNA sequence information. Furthermore, based on our epidemiological results we supported the role of <i>Wolbachia</i> spp. as a common endosymbiont of <i>C. felis</i> and <i>P. irritans</i> and the idea that <i>R. felis</i> is well established in <i>C. felis</i> from Andalusia region (South of Spain) with a prevalence of 28.3%. Finally, we detect for the first time <i>Mycobacterium</i> spp. in fleas from Andalusian region and three different species of <i>Bartonella</i> spp. (<i>B. quintana</i> , <i>B. henselae</i> and <i>B. elizabethae</i>) in <i>S. t. tripectinata</i> and <i>N. fasciatus</i> isolated from Corse.
Order of Authors:	Antonio Zurita Cristina Cutillas Philippe Parola, M.D., Ph.D. Maureen Laroche
Opposed Reviewers:	Lionel Almeras IHU Mediterranee Infection Conflict of Interest
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure Please describe all sources of funding that have supported your work. This information is required for submission and will be published with your article, should	The present work was supported by a FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Research Grant and a grant of the V Plan Propio de Investigación of the University of Seville, Spain (FEMS-RG-2017-0047) obtained by Antonio Zurita. The project leading to this publication was also supported by the French Government under the «Investissements d'avenir» (Investments for the Future) program managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, fr: National Agency for Research), (reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to

<p>it be accepted. A complete funding statement should do the following:</p> <p>Include grant numbers and the URLs of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding.</p> <p>Describe the role of any sponsors or funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If the funders had no role in any of the above, include this sentence at the end of your statement: "<i>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</i>"</p> <p>However, if the study was unfunded, please provide a statement that clearly indicates this, for example: "<i>The author(s) received no specific funding for this work.</i>"</p> <p>* typeset</p>	<p>publish, or preparation of the manuscript.</p>
<p>Competing Interests</p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.</p> <p>Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests)?</p> <p>If yes, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: <i>I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:</i></p> <p>If no authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: "<i>The authors have declared that no competing interests exist.</i>"</p>	<p>The authors have declared that no competing interests exist</p>

* typeset

Ethics Statement

You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or vertebrate animals, embryos or tissues. All information entered here should **also be included in the Methods section** of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.

Human Subject Research (involved human participants and/or tissue)

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.

Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.

Animal Research (involved vertebrate animals, embryos or tissues)

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "[The use of non-human primates in research](#)." The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.

The maintenance of laboratory colony of *C. felis* fleas has been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Medicine at Aix-Marseille University, France. The collection of all the samples for this study in the field did not involve national parks or other protected areas and endangered or protected species.

Catching and handling procedures of animals in this study were carried out according to the guidelines provided by the Institutional Animal Care of the University of Seville based on RD 53/2013 of 1st January, 2013 (BOE number 34 of 8th February, 2013) of the Spanish government. Rodents were trapped using Sherman traps and released into its natural habitat after collecting fleas procedures. Dogs belonged to owners and public dog kennels. The consent of owners and dog kennels chairman was obtained for the inclusion of the dogs in the study. Rodents and dogs were exhaustively and manually examined for fleas through an inspection of head, neck, body, sides, tail, and ventral regions of each animal. No specific approval of any Institutional Animal Care and Use Committee were needed in this study since no anesthesia substances were applied for animal handling procedures.

<p>If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.</p> <p>Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.</p> <p>Field Permit</p> <p>Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.</p>	
<p>Data Availability</p> <p>PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the PLOS Data Policy and FAQ for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.</p> <p>Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.</p> <p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>
<p>Please describe where your data may be found, writing in full sentences. Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is accepted. If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of XXX with the appropriate details.</p>	<p>All relevant data are within the paper and its Supporting Information files</p>

If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, "All relevant data are within the paper and its Supporting Information files."

If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below.

If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:

"Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data."

"Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX."

* typeset

Additional data availability information:

Marseille, 4th March, 2018

Maureen Laroche
VITROME - IHU Méditerranée Infection
19-21 Boulevard Jean Moulin 13005 Marseille

To: **PLOS ONE**

Dear Editor,

We are sending you back the manuscript entitled **“MALDI-TOF MS as a useful tool for rapid identification of flea vectors preserved in alcohol. Detection of flea-associated bacteria by molecular and proteomic methods”** to be considered in publication in *PLOS ONE*.

The authors order has been modified compared to the last version of this manuscript with the consent of all of them. Furthermore, the ethical information has been corrected according to your request. The University of Seville confirmed that the procedures conducted in this study did not require the approval of the IACUC since none of the animals were anesthetized. The Materials & Methods were adjusted accordingly.

The incidences of flea-borne diseases in the world are much greater than are generally recognized by physicians and health authorities. As a result, diagnosis and treatment are often delayed by health care professionals who are unaware of the presence of these infections. From a medical perspective, accurate vector identification at the species level is essential in order to guide decisions related to specific patient monitoring or the administration of preventive treatment. The goal of the present work was to assess the performance of MALDI-TOF MS for the identification of four fleas species (*Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Stenoponia tripectinata tripectinata* and *Nosopsyllus fasciatus*) stored in ethanol and to detect associated microorganisms from these specimens, collected on Corse, the French Mediterranean Island and the South West of Spain, using MALDI-TOF MS and molecular approaches (qPCR and standard PCR). Our results confirm that MALDI-TOF MS could be used for identification of fleas preserved in alcohol in addition to differentiate flea species infected or not by *Bartonella* spp. without the use of a molecular method requiring DNA sequence information. Furthermore, based on our epidemiological results we supported the role of *Wolbachia* spp. as a common endosymbiont of *C. felis* and *P. irritans* and the idea that *R. felis* is well established in *C. felis* from Andalusia region (South of Spain) with a prevalence of 28.3%. Finally, we detect for the first time *Mycobacterium* spp. in fleas from Andalusian region and three different species of *Bartonella* spp. (*B. quintana*, *B. henselae* and *B. elizabethae*) in *S. t. tripectinata* and *N. fasciatus* isolated from Corse.

All authors confirm that the advice to contributors has been read and that the specified conditions have been accepted. All named authors have seen and agreed to the submitted version of the paper, and those who are included in the acknowledgments or as providers of

personal communications have agreed to their inclusion. The manuscript has been tested for plagiarism using our University plagiarism detection software (URKUND) before submission. The manuscript will not be submitted elsewhere for publication while it is under consideration for publication in **PLOS ONE**.

Thank you very much in advance, yours sincerely

Ms. Maureen Laroche

Corresponding author

maureen.laroche972@gmail.com

1 MALDI-TOF MS as a useful tool for rapid identification of flea vectors preserved in
2 alcohol. Detection of flea-associated bacteria by molecular and proteomic methods.

3 Antonio Zurita¹, Philippe Parola², Cristina Cutillas¹, Maureen Laroche^{2*}

4 ¹Department of Microbiology and Parasitology. Faculty of Pharmacy. University of
5 Seville. Professor García González 2, 41012 Seville, Spain.

6 ²Aix Marseille Univ, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, IHU-Méditerranée Infection,
7 Marseille, France.

8 * **Corresponding author:** Ms. Maureen Laroche. VITROME, Institut Hospitalo-
9 Universitaire Méditerranée Infection. 19-21 Boulevard Jean Moulin 13005 Marseille
10 France ; Phone: + 33 (0) 4 13 73 22 23.

11 Email: maureen.laroche972@gmail.com

12

13 **Abstract**

14 In the recent years, an increasing number of papers have reported the importance of
15 fleas and human flea-borne infections, especially in relation to wildlife and zoonotic
16 risk. Some of these flea-borne human pathogens have emerged or re-emerged recently
17 such as *Bartonella henselae* or *Rickettsia felis*. Matrix assisted laser desorption
18 ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been evaluated in
19 the last years for the identification of multicellular organisms, including arthropods. The
20 goal of the present work was to assess the performance of MALDI-TOF MS for the
21 identification of four fleas species (*Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Stenoponia*
22 *triptectinata triptectinata* and *Nosopsyllus fasciatus*) stored in ethanol and to detect
23 associated microorganisms from these specimens, collected on Corse, the French
24 Mediterranean Island and the South West of Spain, using MALDI-TOF MS and
25 molecular approaches (qPCR and standard PCR). Our results confirm that MALDI-TOF
26 MS could be used for identification of fleas preserved in alcohol in addition to
27 differentiate flea species infected or not by *Bartonella* spp. without the use of a
28 molecular method requiring DNA sequence information. Furthermore, based on our
29 epidemiological results we supported the role of *Wolbachia* spp. as a common
30 endosymbiont of *C. felis* and *P. irritans* and the idea that *R. felis* is well established in
31 *C. felis* from Andalusia region (South of Spain) with a prevalence of 28.3%. Finally, we
32 detect for the first time *Mycobacterium* spp. in fleas from Andalusian region and three
33 different species of *Bartonella* spp. (*B. quintana*, *B. henselae* and *B. elizabethae*) in *S. t.*
34 *triptectinata* and *N. fasciatus* isolated from Corse.

35 **Introduction**

36 Vector-borne diseases cause significant morbidity and mortality throughout the world.
37 The majority of recent research and reviews of vector-borne zoonoses focuses on tick-
38 and mosquito borne illnesses, such as Lyme disease and arboviral diseases respectively
39 [1]. Nevertheless, in the last years a high number of studies have reported the
40 importance of fleas and human flea-borne infections, especially in relation to zoonotic
41 risk [2]. Some of these flea-borne human pathogens have re-emerged recently (e.g.,
42 *Bartonella henselae*, *Rickettsia felis*) suggesting that much remains to be learned about
43 the potential role of fleas as disease vectors [1]. We could guess that the cases of flea-
44 borne diseases reported every year in the world could be much lower than it really is. In
45 this sense, health care professionals could not realize about the presence of these
46 zoonosis related with fleas and thus they could fail to choose the most useful diagnosis
47 method and treatment in each case. Furthermore, health authorities should be aware
48 about the distribution and epidemiology of flea-borne diseases in order to be ready for
49 major and dramatic outbreaks and to allocate adequate funding to the surveillance and
50 control in these cases. [3].

51 Accurate vector identification at the species level is essential in order to guide clinicians
52 regarding their patients' care. In this sense, the classification of fleas is relatively
53 advanced, thus we have a lot of knowledge about classical taxonomy of fleas extending
54 their classification to subspecific level in many families [4]. Nevertheless, it requires
55 extensive knowledge of flea morphology and the availability of reference information
56 (identification keys) since they show a complex quetotaxy and morphological
57 specialization associated with ectoparasitism [4]. In the last years, molecular methods
58 have emerged for the purpose of flea identification [4, 5, 6, 7, 8], therefore, different
59 molecular markers from nuclear ribosomal DNA (rDNA) or mitochondrial DNA

60 (mtDNA) have been amplified and sequenced in order to characterize some species.
61 However, despite the several advantages of molecular methods, no consensus sequence
62 exists for the identification of all flea species [7]. This absence of DNA sequence
63 information for a larger number of flea families restricts the use of molecular biology
64 methods for flea identification [9, 10].

65 In the last years MALDI-TOF MS has been used in the last for the identification of
66 various taxonomic groups of arthropods including the *Culicoides* biting midges [11, 12],
67 ticks [13, 14], mosquitoes [15, 16], tsetse flies [17, 18], sand flies [19], fleas [20] and
68 Chagas disease triatomine vectors [21]. A preliminary study corroborated by the first
69 time the usefulness of this technique for the rapid identification of fleas creating a
70 preliminary database containing the spectra of 5 species of fleas (*Ctenocephalides felis*,
71 *Ctenocephalides canis*, *Archaeopsylla erinacei*, *Xenopsylla cheopis* and *Stenoponia*
72 *triptectinata*) [20]. These authors observed differences at the spectral profile level
73 between the fresh specimens and those stored in 70% ethanol of the same species,
74 predominantly by the disappearance of a number of peaks in the profile of specimens
75 conserved in 70% ethanol for more than three months. Recently, [22] proposed
76 guidelines for the automation of sample preparation, including a dealcoholisation
77 protocol for tick samples preserved in 70% ethanol which could be used for another
78 arthropod species.

79 The goal of the present work was to characterize four fleas species (*C. felis*, *Pulex*
80 *irritans*, *Stenoponia triptectinata triptectinata* and *Nosopsyllus fasciatus*) stored in
81 ethanol for different periods of time by MALDI-TOF/MS and to diagnostic associated
82 pathogens from these specimens, collected on Corse Island and the South West of
83 Spain, using MALDI-TOF MS and molecular approaches. Firstly, optimized sample
84 preparation protocol for fleas stored in ethanol for MALDI-TOF MS analysis was

85 established. Secondly, a MS reference spectra database was created based on
86 morphological identification of fleas. In addition, flea associated bacterial pathogens
87 were screened by molecular methods and MS spectra from fleas mono-infected or not
88 by certain bacterial pathogens were compared to assess the usefulness of this proteomic
89 technique for discrimination of fleas according to their infectious status.

90 **Material and Methods**

91 *Ethical statement*

92 The maintenance of laboratory colony of *C. felis* fleas has been approved by the
93 Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Medicine at Aix-
94 Marseille University, France. The collection of all the samples for this study in the field
95 did not involve national parks or other protected areas and endangered or protected
96 species.

97 Catching and handling procedures of animals in this study were carried out according to
98 the guidelines provided by the Institutional Animal Care of the University of Seville
99 based on RD 53/2013 of 1st January, 2013 (BOE number 34 of 8th February, 2013) of
100 the Spanish government. Rodents were trapped using Sherman traps and released into
101 its natural habitat after collecting fleas procedures. Dogs belonged to owners and public
102 dog kennels. The consent of owners and dog kennels chairman was obtained for the
103 inclusion of the dogs in the study. Rodents and dogs were exhaustively and manually
104 examined for fleas through an inspection of head, neck, body, sides, tail, and ventral
105 regions of each animal. No specific approval of any Institutional Animal Care and Use
106 Committee were needed in this study since no anesthesia substances were applied for
107 animal handling procedures.

108 *Sample collection and morphological identification*

109 Fleas were collected between 2011 and 2016 from dogs (*Canis lupus familiaris*) from
110 three localities of the South West of Spain: (Villamanrique de la Condesa, Seville
111 (37°14'47"N 6°18'23"O), Dos Hermanas, Seville (37°17'01"N 5°55'20"O) and Sanlúcar
112 de Barrameda, Cádiz (36°46'44"N 6°21'14"O), while others fleas were collected from
113 an abandoned horse stable with a flea infestation from Seville (37°23'00"N 5°59'00"O).
114 Lastly, some samples were collected from different species of rodents (see Table 1)
115 from Corse Island (42°09'00"N 9°05'00"E). All of flea specimens were preserved in 70
116 % and 96 % ethanol at room temperature until morphological, molecular and MALDI-
117 TOF MS analyses. Some of them were obtained through our own collecting efforts
118 whereas others were obtained through the assistance of colleagues (see
119 Acknowledgements). The first ones were identified by us whereas those fleas provided
120 by our colleagues were first identified by them and then morphologically corroborated
121 by us in our laboratory. Genera and specific identification was carried out according to
122 different authors and taxonomic keys [5, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34].
123 For morphological analysis, all specimens were examined and photographed using a
124 Nikon microscope equipped with a camera lucid system and a photomicroscope.

125 *Molecular detection of pathogens*

126 For DNA amplification the abdomens of each specimen were cut off and transferred to a
127 1.5 mL tube containing 180 µL of G2 lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany), and 20
128 µL of proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany), and incubated at 56° C overnight. DNA
129 extraction was performed with an EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
130 according to manufacturer recommendations. Flea DNAs were then eluted in 100 µL of
131 Tris EDTA buffer using the DNA extracting EZ1 Advanced XL Robot (Qiagen, Hilden,
132 Germany). The DNA was either immediately used or stored at -20° C until molecular

133 analysis. The DNA extracting EZI Advanced XL Robot was disinfected after each batch
134 of extraction as per the manufacturer's recommendations, to avoid cross-contamination.

135 Quantitative PCR was performed according to the manufacturer's protocol using a PCR
136 detection system; a CFX Connect™ Real-Time (Bio-Rad) with the Light Cycler 480
137 Probes Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France). The qPCR reaction contained
138 10 µl of Takyon Master Mix (Takyon, Eurogentec, Belgium), 3 µl sterile distilled water,
139 0.5 µl of each of the primers, 0.5 µl of Uracil-DNA-glycosylase (*UDG*), 0.5 µl of probe
140 and 5 µl of the DNA extract. All samples were screened using primers and probes,
141 targeting specific sequences of the following bacterial pathogens: *Rickettsia* spp.,
142 *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, Anaplasmataceae spp., *Wolbachia* spp., *Borrelia* spp.,
143 *Bartonella* spp., *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Coxiella burnetii* and
144 *Mycobacterium* spp. The primers and probes references plus targeted sequences used to
145 amplify each pathogen by real-time quantitative PCR are summarized in table 2. DNAs
146 from our laboratory cultures of *R. montanensis*, *R. felis*, *R. typhi*, *A. phagocytophilum*,
147 *W. pipientis*, *B. crocidurae*, *B. quintana*, *B. henselae*, *C. burnetii* and *M. ulcerans* were
148 used as PCR positive controls. For *C. burnetii* two genes were tested in order to avoid
149 false positives, thus only the samples positive for both genes were considered. For all
150 samples tested by qPCR, only those with a cycle threshold (Ct) lower than 35 were
151 considered positive for the bacteria analyzed. *Bartonella* spp.-positive samples that were
152 negative for *B. henselae* and *B. quintana*-specific qPCRs were subsequently subjected
153 to standard PCR prior to sequencing in order to obtain identification to the species level.

154 Anaplasmataceae-positive samples which were negative in PCR targeting *Wolbachia*
155 sp. were also sequenced. The primers references and targeted sequences used for
156 standard PCR in this study are summarized in table 2. A Bio-Rad Thermocycler (Bio-
157 Rad Laboratories, Hercules, California, USA) was used to amplify the target gene prior

158 to sequencing. The cycling protocol and PCR mix were described by [27].
159 Amplification products were visualized by electrophoresis through a 1.5 % agarose-tris-
160 borate-EDTA gel containing SYBR Safe. PCR products were sequenced in both
161 directions using a Big Dye Terminator kit and an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer
162 (Applied BioSystems, Courtabeuf, France). The sequences were analysed using the
163 ABIPRISM DNA Sequencing Analysis software version 3.0 (Applied BioSystems) and
164 compared with sequences available in the GenBank database using the BLAST
165 algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

166 *MALDI-TOF MS analyses*

167 According to Diarra *et al.* [27] previously published dealcoholisation protocol of
168 arthropods for MALDI-TOF, each sample (flea legs and cephalothorax) was introduced
169 in a sterile Eppendorf and dried overnight at 37° C, prior to homogenization in order to
170 remove all the ethanol. Secondly, a sterile tungsten bead (Qiagen, Hilden, Germany)
171 was added to each sample plus 20 µL of a mix of 70 % (v/v) formic acid and 50 % (v/v)
172 acetonitrile (Fluka, Buchs, Switzerland). The samples were then homogenized using the
173 TissueLyser device (Qiagen, Hilden, Germany) by 3 cycles of 30s at a frequency of
174 30Hz. The homogenized cephalothorax and legs of fleas were centrifuged at 10000 rpm
175 for 30 seconds and 1 µL of the supernatant from each sample was carefully dropped
176 onto the MALDI-TOF target plate as previously described [49]. Each spot was then
177 recovered with 1 µL of CHCA matrix solution composed of saturated α -cyano-4-
178 hydroxycinnamic acid (Sigma, Lyon, France), 50 % acetonitrile (v/v), 2.5 %
179 trifluoroacetic acid (v/v) (Aldrich, Dorset, UK) and HPLC-grade water [50]. The target
180 plate, after drying for several minutes at room temperature, was introduced into the
181 Microflex LT MALDI-TOF Mass Spectrometer device (Bruker Daltonics, Germany)
182 for analysis. The loading of the MS target plate, the matrix quality, and the performance

183 of the MALDI-TOF were performed as previously described [49]. For each target plate
184 we used one specimen of *C. felis* from the University Hospital Institute Méditerranée
185 Infection of Marseille laboratory rearing as a positive control and two 2 µL of CHCA
186 matrix solution as a negative control. Protein mass profiles were obtained using a
187 Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) using
188 parameters previously described by [51]. The spectrum profiles obtained were
189 visualized with Flex analysis v.3.3 software and exported to ClinProTools software
190 v.2.2 and MALDI-Biotyper v.3.0. (Bruker Daltonics, Germany) for analysis and data
191 processing (smoothing, baseline subtraction and peak picking). MSPs of each species
192 were created as previously described [49]. Only the high quality and reproducible
193 spectra were loaded into the MALDI Biotyper v3.0 to create a spectral database with 3–
194 5 specimens for each species as previously described [22]. To upgrade the database,
195 MSP reference spectra were created using spectra from at least three specimens per
196 species by the automated function of the MALDI-Biotyper software v3.0. (Bruker
197 Daltonics). MS spectra were created with an unbiased algorithm using information on
198 the peak position, intensity and frequency. This database was formerly composed of a
199 total of five flea species (*Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Archaeopsylla*
200 *erinacei*, *Xenopsylla cheopis* and *Stenoponia tripectinata*) plus others arthropods
201 species described in [21]. The spectra files are available on request and transferable to
202 any Bruker MALDI-TOF device.

203 For the blind test analysis 87 spectra from the four species including infected and
204 uninfected fleas were all selected to query the upgraded database. Since the protein
205 extracted from each specimen was spotted on the MALDI-TOF target plate in
206 quadruplicate, each specimen was associated with four spectra. The results of the
207 database queries are presented as log score values (LSVs) for each spectrum,

208 corresponding to a matched degree of signal intensities of mass spectra of the query and
209 the reference spectra. LSVs range from 0 to 3. LSVs allow good evaluation of the
210 reproducibility between a queried spectrum and a reference spectrum as it is the result
211 of thorough comparison of peaks position and intensity between those two spectra. A
212 LSV was obtained for each spectrum of the samples tested blindly. For each specimen,
213 the spectrum with the highest LSVs was selected for identification. Up to three levels of
214 identification were assessed here. Identification was considered perfect if species were
215 identified correctly in blind test analyses.

216 On the other hand, in order to visualize MS profiles similarity and distances,
217 hierarchical clustering of the mass spectra of eight specimens of each tested species was
218 performed using the dendrogram function of MALDI Biotyper, version 3.0.
219 Dendrograms are based on the results of Composite Correlation Index (CCI) matrix.
220 CCIs are calculated by dividing spectra into intervals and comparing these intervals
221 across a dataset. The composition of correlations of all intervals provides the CCI,
222 which is used as a parameter that defines the distance between spectra. A CCI match
223 value of 1 represents complete correlation, whereas a CCI match value of 0 represents
224 an absence of correlation [21]. Finally, in order to compare MS spectra from fleas
225 infected or not by bacterial pathogenic, ClinProTools v.2.2 software (Bruker Daltonics,
226 Germany) was used in order to identify the specific peaks related to the infection status
227 of the flea. The parameters for ClinProTools software analysis were similar to those
228 previously described by [14]. An average spectrum was generated for each infecting
229 condition (i.e., flea species infected or not by *Bartonella* spp). In addition, Principal
230 Component Analysis (PCA) were done in order to compare visually MS spectra of both
231 infectious statuses. The detection of discriminating peak masses was performed by
232 comparison of the average spectrum generated between the two groups.

233 **Results**

234 *Morphological identification*

235 A total of 121 fleas were collected for this study. Four different species of fleas were
236 identified in our study (*C. felis*, *P. irritans*, *N. fasciatus* and *S. t. tripectinata*). All
237 specimens collected from Villamanrique de la Condesa, Dos Hermanas, Sanlúcar de
238 Barrameda, and six samples from Seville showed specific morphological characteristics
239 of *C. felis*. On the other hand, *P. irritans* was only collected from Seville, while
240 specimens collected from Corse showed morphological characteristics of *N. fasciatus*
241 and *S. t. tripectinata* (Table 1).

242 *Bacteria detection in fleas*

243 A total of 121 fleas belonging to four different species (*C. felis*, *P. irritans*, *S. t.*
244 *tripectinata* and *N. fasciatus*) were tested to assess the prevalence of certain genera and
245 species bacteria (Table 3). All the samples showed qPCR negative results for the
246 presence of *R. typhi*, *C. burnetti* and *Borrelia* spp. On the other hand, *Wolbachia* sp.
247 was detected by qPCR in *C. felis* and *P. irritans* with a prevalence of 60.4 % and 95.7
248 %, respectively, while *R. felis* was detected only in *C. felis* with a prevalence of 28.3 %.
249 Furthermore *Mycobacterium* spp. was detected by qPCR in one specimen of *C. felis* and
250 one specimen of *P. irritans* (2.0 % and 4.3 % of prevalence) targeting the internal
251 transcribed spacer (Table 3). A specific identification of both positive samples was
252 carried out targeting *rpoB* gene of *Mycobacterium* spp. by standard PCR; however we
253 were not able to obtain positive results using this technique. Lastly, the screening of all
254 fleas for *Bartonella* spp. revealed that this pathogen was present in *P. irritans*, *S. t.*
255 *tripectinata* and *N. fasciatus*. Using qPCR technique we were able to identify *B.*
256 *henselae* and *B. quintana* in *S. t. tripectinata* and *N. fasciatus* with a percentage of

257 prevalence ranging from 9.1 % to 13.6 % (Table 3). The remaining *Bartonella* spp.
258 positive samples were tested for a specific *Bartonella* identification using standard PCR
259 targeting *gltA* gene and 16S-23S intergenic spacer region. Unfortunately, we could
260 amplify the *gltA* gene of *Bartonella* spp only in one specimens of *N. fasciatus*
261 *Bartonella* spp. positive. The BLAST analysis showed a homology of 94% between our
262 sequence and *B. elizabethae* (GenBank ACCN KP126480). When we tried to amplify
263 the ITS region of this pathogen, only three *Bartonella* spp. positive specimens of *S. t.*
264 *tripectinata* showed positive results. These sequences showed a homology percentage
265 value of 98 % with *Bartonella* sp. (GenBank ACCN LN847263) which was identified
266 as *B. elizabethae* by [52].

267 *MALDI-TOF MS analyses*

268 Using the sample homogenization and preparation protocol described in material and
269 methods section, we were able to obtain high quality spectra (high reproducibility and
270 high intensity of MS spectra) from cephalothorax and legs of each flea species assessed
271 in this study. Thus, reproducible and specific MALDI-TOF MS spectra profiles were
272 obtained for each flea species. Furthermore, we upgraded the database with nineteen
273 new reference spectra from four species *C. felis* (n=6), *P. irritans* (n=3), *S. t.*
274 *tripectinata* (n=5) and *N. fasciatus* (n=5). Representative MS profiles obtained for each
275 flea species with high intensities peaks in the range of 2–20 kDa are presented in Fig. 1.

276 All the 87 specimens used from blind test were queried successively against the
277 upgraded MS reference database. Using this database, the blind test yielded 100 %
278 correct identification at the species level for the specimens tested, indistinctly of their
279 infectious status or their geographical origin in the case of *C. felis*. For the blind test of
280 *C. felis*, 32 specimens were used of which 29 (90.6 %) were correctly identified with

281 high LSVs ranging from 1.80 to 2.54 while 3 of them were correctly identified with low
282 LSVs ranging from 1.305 to 1.66. Regarding *P. irritans* a total of 20 samples
283 were queried and were all identified with high LSVs (1.84-2.35). Similar results were
284 observed for *S. t. tripectinata* (17 samples) and *N. fasciatus* (18 samples) blind tests.
285 Thus, we observed high LSVs ranging from 1.87 to 2.27 and from 1.87 to 2.28,
286 respectively. It is noteworthy that the profile of the spectra of specimens preserved in
287 alcohol always showed a correct identification with low LSVs or a wrong identification
288 when they were first compared with MS spectra of fresh specimens of the same species
289 which had already been added at the database. Ultimately, the results of the blind test
290 showed 100% concordance between morphological identification and MALDI-TOF MS
291 identification.

292 To assess the presence of discriminating peaks (m/z values) according to the fleas-
293 infectious status we set, for each flea species, a control group composed by at least ten
294 samples uninfected for any pathogen which was compared with an infected group
295 composed for at least 3 samples of the same species infected by the same pathogen.
296 Unfortunately, the control group could be established only for *N. fasciatus* and *S. t.*
297 *tripectinata* species since for *C. felis* and *P. irritans* we did not obtain a representative
298 number of uninfected fleas. Principal Component Analysis (PCA) including *S. t.*
299 *tripectinata* control groups and *S. t. tripectinata Bartonella* infected groups revealed in
300 all the cases no overlapping areas between infected and non-infected groups (Fig. 2A-
301 C). These spectra differences were corroborated by the comparison of the average
302 spectrum generated between the two groups (infected and non-infected). This
303 comparison revealed the appearance of some discriminating peaks in those *S. t.*
304 *tripectinata* samples infected by *B. elizabethae*, *B. henselae* and *B. quintana* (Fig. 3 and
305 4). According to *N. fasciatus*, the PCA based on the control group and the samples

306 infected by *B. henselae* showed both groups separated each other with a minor
307 overlapping area (Fig. 2D). Nevertheless, unlike *S. t. tripectinata*, the average spectrum
308 comparison not revealed the existence of discriminating peaks between both groups.

309 On the other hand, dendrogram based on the four flea species MS profile showed all the
310 species provided highly specific spectra. Furthermore *P. irritans* and *C. felis* (Pulicidae)
311 appeared clustering together and separated from *N. fasciatus* (Ceratomyzidae) and *S. t.*
312 *tripectinata* (Stenoponiidae) (Fig. 5).

313 **Discussion**

314 MALDI-TOF/MS technique has emerged as an efficient approach for the rapid
315 identification of fleas but with certain limitations [20]. Thus, to fully exploit the use of
316 MALDI-TOF MS for the identification of arthropods, by sharing databases between
317 laboratories, a standardization of operational protocols is required, including sample
318 preparation and MS compatibility of usual storage modes [49]. The 96 % and 70 %
319 ethanol is a frequent mode used in the field for arthropod conservation and transport,
320 which are less restrictive than frozen methods and especially useful for molecular
321 purposes [53, 54]. However, previous studies revealed some limitations when samples
322 preserved in alcohol were used for MALDI-TOF MS analyses, especially when they
323 have been stored for long periods [20, 49]. Nevertheless, Diarra et al. [27] have shown
324 that these limitations could be circumvented on ticks by specific dealcoholisation
325 protocols. Therefore, in this work we provided by the first time a reliable MALDI-TOF
326 MS sample preparation protocol for fleas stored in ethanol for different periods of time.
327 The application of this technique to the specific identification of fleas is very interesting
328 because most of flea morphological identification keys are outdated and not always
329 available. Another advantage of this technique is that it is useful to identify fleas that

330 could be damaged, and therefore, the morphological characteristics would be deformed
331 or even disappear making morphological identification very difficult or in some cases
332 almost impossible. We agree with previous studies reporting that the use of the body of
333 a flea without the abdomen was the best sample for distinguishing flea species by the
334 MALDI-TOF/MS approach [20]. Nevertheless, based on the results obtained in this
335 study, we were able to set a suitable homogenization protocol in order to obtain higher
336 quality and more reproducible spectra from fleas preserved in 96 % and 70 % ethanol
337 for different periods of time. Therefore, using this new homogenization protocol we
338 were able to correctly identify four different flea species preserved in ethanol from one
339 year (*N. fasciatus*, *P. irritans* and *S. t. tripectinata*) to more than six years (*C. felis*).
340 This fact was corroborated by blind test which results showed that all specimens were
341 correctly identified by MALDI-TOF MS and only 3 % of them were well identified
342 with low LSVs. Furthermore, dendrogram results seem to show the usefulness of this
343 technique to discriminate at species and family taxonomic levels. On the other hand,
344 although our results confirm that MALDI-TOF MS could be used for identification of
345 fleas preserved in alcohol, it requires the creation of a database with specimens stored in
346 the same condition since spectra from fresh specimens differ from those obtained from
347 alcohol-stored specimens. In this sense, we updated the preliminary database with the
348 spectra of four flea species stored in ethanol (*C. felis*, *P. irritans*, *N. fasciatus* and *S. t.*
349 *tripectinata*). Instead of the small diversity of flea species included in the MS spectra
350 reference database, we should take into account that the high-throughput and large
351 application of MALDI-TOF MS observed for microorganisms identification either in
352 research or medical diagnosis could stir up medical entomology in fleas field in the
353 same way.

354 In the present work we detected the endosymbiont *Wolbachia* spp. in *C. felis* and *P.*
355 *irritans* specimens with high percentages of prevalence. Our results strongly support the
356 role of *Wolbachia* spp. as a common endosymbiont of *C. felis* and *P. irritans*.
357 Furthermore, our results are in agreement with other recent studies which have shown a
358 high prevalence of this bacterium in these two flea species [55, 56]. In this sense, Zurita
359 *et al.* [52] detected this endosymbiont with a prevalence of 69.44% in *C. felis* isolated
360 from dogs from different regions of the South West of Spain. The absence of *Bartonella*
361 sp. in *C. felis* from Spain observed in our study is in agreement with Gracia *et al.* [57]
362 who found 5.3% and 0% of prevalence of *Bartonella* spp. in cat fleas from Andalusia
363 and the Balearic Islands, respectively. Furthermore, Zurita *et al.* [52] also observed the
364 absence of *Bartonella* sp. in *C. felis* from Southwest of Spain, Mallorca (Balearic
365 archipelago) and other regions of Iran and South Africa suggesting that this fact could
366 be the consequence of a possible antagonistic effect among *Wolbachia* sp. and
367 *Bartonella* sp. For this reason, some authors such as Segoli *et al.* [58] and Slatko *et al.*
368 [59] have recently studied the role of *Wolbachia* sp. as a target for the intervention of
369 insect pathogens transmission since this possible antagonistic effect among *Wolbachia*
370 sp. and other bacteria, which could decrease cases of co-infection. Nevertheless,
371 according to Dittmar and Whiting [60] and Zurita *et al.* [52]. In spite of this, to assume
372 this hypothesis, more exhaustive studies are needed in flea field since the studies about
373 the role of *Wolbachia* sp. in this group of insects are scarce. Thus, currently, we do not
374 have a great knowledge about the potentially widespread of this endosymbiont in wild
375 flea populations, the effects of this bacterium upon the hosts or the practical
376 implications of such infections.

377 *R. felis* is considered as an emergent pathogen which can infect humans causing clinical
378 features which can include fever, fatigue, headache, generalized maculopapular rash and

379 inoculation eschar(s) [61]. Some studies related with this bacterium demonstrate that the
380 main reservoir of *R. felis* is the cat flea (*C. felis*) [61, 62]. Nowadays, It is known 12
381 species of fleas, 8 species of ticks and 3 species of mites which can be infected by *R.*
382 *felis* [62]; however, further studies are needed in order to confirm the role of these
383 species as possible vectors of this infectious agent. Furthermore, some recent studies
384 have revealed that this Rickettsiae could be the causal agent of unknown fever in Sub-
385 Saharan Africa (FUO), thus, *R. felis* has been detected in several mosquito species in
386 this geographical area [63, 64].

387 In our study, *R. felis* was detected only in *C. felis* with a prevalence of 28.3%. These
388 results support the idea that this pathogen is well established in Andalusia (South of
389 Spain) since in the last years some studies have reported the presence of this emerging
390 flea-borne pathogen in this region based on serological and molecular techniques of
391 detection in fleas, cats and humans. These studies observed a *R. felis* prevalence ranged
392 from 6.5% [65] to 36.8% [57]. Furthermore our study agrees with Brown and Macaluso
393 [66] who consider *C. felis* as the primary vector and reservoir of *R. felis* being the
394 worldwide distribution of this pathogen attributed to the equally widespread prevalence
395 of this flea species.

396 Unlike *R. felis* which prevalence has been widely studied in fleas from several
397 countries, this work constitutes the first attempt to detect *Mycobacterium* spp. in fleas.
398 Nevertheless, different species of this genus such as the etiological agent of the Buruli
399 ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans*) has recently been detected by qPCR in water
400 bugs [67, 68] and mosquitoes [69]. In this study we detected *Mycobacterium* spp. in two
401 fleas from Seville but, unfortunately, we were not able to amplify and sequence
402 *Mycobacterium* qPCR-positive samples by standard PCR in order to carry out a specific
403 classification. This fact could be explained by the higher sensitivity of qPCR compared

404 to standard PCR [70]. Therefore, although we could not determine with which species
405 of *Mycobacterium* we dealt with, this study is the first report of the detection of
406 *Mycobacterium* spp. in fleas. In this sense, more epidemiologic studies about this
407 bacterium genus should be done in order to set up an experimental model which let us
408 to evaluate if fleas really play a role in its transmission.

409 Nowadays, it is known several specific *Bartonella* spp. zoonoses which can occur in
410 humans such as Cat-Scratch Disease (CSD), Carrion's disease or trench fever [71].
411 Furthermore, these infections can show important symptoms such as endocarditis,
412 bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, chronic bacteremia, chronic lymphadenopathy,
413 or neurologic disorders [71]. Particularly, *B. henselae* and *Bartonella clarridgeiae* are
414 considered the main causative agents for CSD, while *B. quintana*, *B. elizabethae*, *B.*
415 *henselae*, or *Bartonella koehlerae* have been related to human and animal endocarditis
416 in several countries [72, 73]. Additionally, a large list of mammals are considered the
417 main host species harboring *Bartonella* spp. out of which several species are kept as
418 pets [74]. The main host infection mechanism for *Bartonella* spp. is by arthropod saliva
419 (fleas, sand flies, lice and ticks) or by flea feces and the scratch or bite of cats in the
420 case of CSD [72, 75].

421 Three different species of *Bartonella* were detected in *P. irritans*, *S. t. tripectinata* and
422 *N. fasciatus* in this study. This pathogenic genus showed a prevalence of 8.7 % in *P.*
423 *irritans* isolated from Seville. Although we were not able to carry out a specific
424 identification of these positive samples, our results support the idea that *P. irritans* may
425 act as a vector of *Bartonella* spp. in the South of Spain. This fact was corroborated by
426 Márquez *et al.* [76] who observed a prevalence of 31.8 % of this pathogen in *P. irritans*
427 isolated from Andalusian region (Huelva and Jaén). On the other hand, three different
428 species of *Bartonella* (*B. quintana*, *B. henselae* and *B. elizabethae*) were detected in *S. t.*

429 *tripectinata* isolated from Corse Island. This study assesses, for the first time, the
430 prevalence of *Bartonella* species in fleas isolated from Corse. Nevertheless, *S. t.*
431 *tripectinata* has been recently reported to be a potential vector of *B. elizabethae* in the
432 the Canary Islands [52, 77]. Furthermore, according with our results, *N. fasciatus* could
433 also be a potential vector of *B. elizabethae* and *B. henselae* in Corse Island. As far as we
434 know, this is the first evidence of the presence of *B. henselae*, *B. elizabethae* and *B.*
435 *quintana* in arthropod vectors from the Corse Island. For that reason, epidemiological
436 data provided in this work demonstrate that *S. t. tripectinata* and *N. fasciatus* may act as
437 potential vectors of different *Bartonella* species in Corse Island and might play
438 important roles in human infection in this area. Thus, the zoonotic character of these
439 infections must alert public health authorities and the veterinary community about the
440 risk of possible diseases associated with these flea species.

441 In our work, MALDI-TOF MS analysis was able to reveal discriminating peaks
442 between fleas which were infected or not by *Bartonella* different species. However, in
443 our study we did not add any reference MS spectra for *Bartonella* infected fleas to the
444 database since a more representative number of *Bartonella* positive fleas of each species
445 would be necessary in order to carry out a reliable blind test to discriminate between
446 infected and non-infected samples. Our results are nevertheless in agreement with
447 previous studies who confirmed the usefulness of this technique for the differentiation
448 of ticks infected or not by *Borrelia* spp. or spotted fever group rickettsiae [78, 79].
449 These authors added two different MS spectra for each tick species according to the
450 infectious status of them. These results are encouraging regarding the use of MALDI-
451 TOF MS for the detection of infected or uninfected fleas by *Bartonella* spp. without the
452 use of a molecular method requiring DNA sequence data. This work also demonstrated
453 that MALDI-TOF MS could be applied for the rapid detection of *Bartonella* spp in fleas

454 parasitizing wild animals, humans and several livestock species. The rapid identification
455 of flea species and their infectious status by MALDI-TOF MS in only one step would
456 constitute a relevant discover in epidemiology and entomology field since this technique
457 shows some advantages compared with classic and molecular methods such as the low
458 consumable costs, the minimal time required for sample preparation or the rapid
459 availability of the results. This technique could also be established as a useful tool in
460 order to increase our knowledge about flea-borne diseases especially when it comes to
461 choose a specific preventive treatment or taking action to control possible future
462 outbreaks.

463 **Acknowledgments**

464 The present work was supported by a FEMS (Federation of European Microbiological
465 Societies) Research Grant and a grant of the V Plan Propio de Investigación of the
466 University of Seville, Spain. The authors thank Dr Carlos Feliu (University of
467 Barcelona) for providing samples from Corse (France). The project leading to this
468 publication was supported by the French Government under the « Investissements
469 d'avenir » (Investments for the Future) program managed by the Agence Nationale de la
470 Recherche (ANR, fr: National Agency for Research), (reference:Méditerranée Infection
471 10-IAHU-03).

472 **Author Contributions**

473 Conceived and designed the experiments: Cristina Cutillas, Philippe Parola.

474 Performed the experiments: Antonio Zurita, Maureen Laroche.

475 Analyzed the data: Antonio Zurita, Maureen Laroche.

476 Contributed reagents/materials/analysis tools: Cristina Cutillas, Maureen Laroche,
477 Philippe Parola.

478 First drafted the paper: Antonio Zurita.

479 Wrote the paper: Antonio Zurita, Cristina Cutillas, Maureen Laroche, Philippe Parola.

480 **References**

- 481 1. Eisen RJ, Gage KL. Transmission of flea-borne zoonotic agents. A Rev
482 Entomol. 2012; 57: 61–82.
- 483 2. Leulmi H, Socolovschi C, Laudisoit A, Houemenou G, Davoust B, Bitam I, et
484 al. Detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, *Bartonella* Species and *Yersinia*
485 *pestis* in Fleas (Siphonaptera) from Africa. PLoS Negl Trop Dis; 2014; 9;
486 8(10):e3152. doi: 10.1371/journal.pntd.0003152.
- 487 3. Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne
488 diseases. Int J Infect Dis. 2010; 14:667–676.
- 489 4. Whiting MF, Whiting AS, Hastriter MW, Dittmar K. A Molecular phylogeny of
490 fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. Cladistics. 2008; 24:
491 677–707.
- 492 5. Marrugal A, Callejón R, de Rojas M, Halajian A, Cutillas C. Morphological,
493 biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and
494 *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions.
495 Parasitol Res. 2013; 112: 2289–2298.
- 496 6. Lawrence AL, Brown GK, Peters B, Spielman DS, Morin-Adeline M, Slapeta, J.
497 High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two
498 mitochondrial DNA markers. Med Vet Entomol. 2014; 28: 330–336.

- 499 7. Zurita A, Callejón R, De Rojas M, Gómez-López MS, Cutillas C. Molecular
500 study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae:
501 Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny. B Entomol
502 Res. 2015; 104: 704–711.
- 503 8. Zurita A, Callejón R, De Rojas M, Cutillas C. Morphological and molecular
504 study of the genus *Nosopsyllus* (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *Nosopsyllus*
505 *barbarus* (Jordan & Rothschild 1912) as a junior synonym of *Nosopsyllus*
506 *fasciatus* (Bosc, d'Antic 1800). Ins Syst Evol. 2018; 49: 81-101.
- 507 9. Fang Q, Keirans JE, Mixson T. The use of the nuclear protein-encoding gene,
508 RNA polymerase II, for tick molecular systematics. Exp Appl Acarol. 2002; 28:
509 69-75.
- 510 10. Feltens R, Görner R, Kalkhof S, Gröger-Arndt H, von Bergen M. Discrimination
511 of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using
512 matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. BMC Evol Biol.
513 2010; 10:95. doi: 10.1186/1471-2148-10-95.
- 514 11. Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pfluger V, Pathis A.
515 Evaluation of matrixassisted laser desorption/ionization time of flight mass
516 spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. Med.
517 Vet Entomol 2011, 25: 32-38.
- 518 12. Kaufmann C, Schaffner F, Ziegler D, Pfluger V, Mathis A. Identification of field
519 caught *Culicoides* biting midges using matrix assisted laser
520 desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasitology. 2012; 139:
521 248-258.
- 522 13. Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, Hoffmann B, Süss J &
523 Klaus C. Species determination and characterization of developmental stages of

- 524 ticks by whole animal matrix assisted laser desorption/ionization mass
525 spectrometry. Ticks Tick Borne Dis. 2012; 3: 78-89.
- 526 14. Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger JM, et al.
527 Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for
528 rapid identification of tick vectors. J Clin Microbiol. 2013, 51: 522-528.
- 529 15. Müller P, Pflüger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, et al.
530 Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein
531 profiling. PLoS One. 2013; 8: e57486.
- 532 16. Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath MO, Sougoufara S, Dehecq JS.
533 Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: an
534 emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. PLoS One. 2013;
535 8: e72380.
- 536 17. Hoppenheit A, Murugaiyan J, Bauer B, Steuber S, Clausen PH, Roesler U.
537 Identification of Tsetse (*Glossina* spp.) using matrix assisted laser
538 desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. PLoS Negl Trop Dis.
539 2013; 7: e2305.
- 540 18. Hoppenheit A, Murugaiyan J, Bauer B, Clausen PH, Roesler U. Analysis of
541 *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* from two distant
542 locations in Burkina Faso using MALDI-TOF MS. Parasitol Res. 2014, 113:
543 723-726.
- 544 19. Dvorak V, Halada P, Hlavackova K, Dokianakis E, Antoniou M, Volf P.
545 Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix
546 assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasit.
547 Vectors. 2014, 10 (1): e0004351.

- 548 20. Yssouf A, Socolovschi C, Leulmi H, Kernif T, Bitam I, Audoly G, Almeras L,
549 Raoult D & Parola P. Identification of flea species using MALDITOF/MS.
550 Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2014; 37: 153-157.
- 551 21. Laroche M, Bérenger JM, Gazelle G, Blanchet D, Raoult D, Parola P. MALDI-
552 TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease
553 triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana.
554 Parasitology. 2017; doi: 10.1017/S0031182017001743.
- 555 22. Diarra AZ, Almeras L, Laroche M, Berenger JM, Koné AK, Bocoum Z, et al.
556 Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria
557 in Mali. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(7):e0005762.
- 558 23. Jordan, K, Rothschild NC. On Siphonaptera collected in Algeria. Novitates
559 Zoologicae. 1912; 19: 357-372.
- 560 24. Hopkins, GHE, Rothschild, M. An Illustrated Catalogue of the Rothschild
561 Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History),
562 Tungidae and Pulicidae, Vol. 1. Trustees of the British Museum (Natural
563 History), London, 1953.
- 564 25. Gil Collado J. Pulgas españolas parásitas de roedores. Revista Ibérica de
565 Parasitología. 1949; 9: 214-258.
- 566 26. Jordan, K. A contribution to the taxonomy of *Stenoponia* J. & R. (1911), a genus
567 of Palaearctic and Nearctic fleas. 1958; British Museum (Natural History) 6: 169-
568 202.
- 569 27. Lewis, RE. Contributions to a taxonomic revision of the genus *Nosopsyllus*
570 Jordan, 1933. J Med Entomol. 1967; 4: 123-142.
- 571 28. Hastriter, MW, Tipton, VJ. Fleas (Siphonaptera) associated with small mammals
572 of Morocco. J Egypt Public Health Ass. 1975; 50: 79-169.

- 573 29. Beaucournu, JC, Launay H. Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin
574 méditerranéen occidental, Faune de France, Vol. 76. Fédération Française des
575 Sociétés des Sciences Naturelles, Paris, 1990.
- 576 30. Lewis, RE. Notes on the geographical distribution and host preferences in the
577 order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a
578 current classification of the order. J Medl Entomol. 1993; 30: 239-256.
- 579 31. Giannetto S, Virga A, Iori A. New record of *Nosopsyllus* (*Nosopsyllus*)
580 *barbarus* (Jordan and Rothschild, 1912) (Aphaniptera: Dolichopsyllidae) from
581 Sicily. Morphology at scanning electron microscopy of *N. (N.) barbarus* and *N.*
582 (*N.*) *fasciatus* (Bosc D'Antic, 1800). Parassitologia. 1997; 39: 29–32.
- 583 32. Beaucournu, JC, Ménier K. Le genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930
584 (Siphonaptera, Pulicidae). Parasite. 1998; 5: 3-16.
- 585 33. Ménier K, Beaucournu JC. Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides*
586 Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus
587 characters. J Med Entomol. 1998; 35: 883-890.
- 588 34. Acosta R, Morrone JJ. Phylogenetics of the tribe Phalacrocyllini (Siphonaptera:
589 Ctenophthalmidae: Neopsyllinae) based on molecular and morphological
590 evidence. Zootaxa. 2013; 3630: 333-346.
- 591 35. Rolain JM, Stuhl L, Maurin M, Raoult D: Evaluation of antibiotic
592 susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a
593 quantitative PCR DNA assay. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46
594 (9):2747-51.
- 595 36. Dieme C, Bechah Y, Socolovschi C, Audoly G, Berenger JM, Faye O, et al.
596 Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae*
597 mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112 (26): 8088-93.

- 598 37. Luce-Fedrow A, Mullins K, Kostik AP, St John HK, Jiang J, Richards AL.
599 Strategies for detecting rickettsiae and diagnosing rickettsial diseases. Future
600 Microbiol. 2015; 10 (4): 537-64.
- 601 38. Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella*
602 *quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and
603 *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. Emerg Infect Dis. 2003; 9 (3): 338-342.
- 604 39. Angelakis E, Roux V, Raoult D, Rolain JM. Real-time PCR strategy and
605 detection of bacterial agents of lymphadenitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
606 2009; 28 (11) :1363-1368.
- 607 40. Angelakis E, Rolain JM, Raoult D, Brouqui P. *Bartonella quintana* in head
608 louse nits. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011; 62 (2): 244-246.
- 609 41. Mediannikov O, Trape JF, Diatta G, Parola P, Fournier PE, Raoult D. *Rickettsia*
610 *africae*, Western Africa. Emerg Infect Dis. 2010; 16 (3): 571-573.
- 611 42. Rolain JM, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera
612 during Q fever. QJM. 2005; 98 (8):615-7.
- 613 43. Djiba ML, Mediannikov O, Mbengue M, Thiongane Y, Molez JF, Seck MT, et
614 al. Survey of Anaplasmataceae bacteria in sheep from Senegal. Trop Anim
615 Health Prod. 2013; 45 (7): 1557-61.
- 616 44. Willems H, Thiele D, Frölich-Ritter R, Krauss H. Detection of *Coxiella burnetii*
617 in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). Zentralbl
618 Veterinarmed B. 1994; 41 (9): 580-587.
- 619 45. Bruijnesteijn Van Coppenraet ES, Lindeboom JA, Prins JM, Peeters MF, Claas
620 EC, Kuijper EJ. Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue
621 biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in
622 children. J Clin Microbiol. 2004; 42 (6): 2644-2650.

- 623 46. La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for
624 species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. Trends Microbiol.
625 2003; 11 (7): 318-321.
- 626 47. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid
627 identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR
628 assay. J Clin Microbiol. 2000; 38 (5): 1717-1722.
- 629 48. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of
630 nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J Clin
631 Microbiol. 2003; 41 (12): 5699-5708.
- 632 49. Nebbak A, El Hamzaoui B, Berenger JM, Bitam I, Raoult D, Almeras L, et al.
633 Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for
634 tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. Med Vet Entomol.
635 2017; 31 (4): 438-448.
- 636 50. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of
637 arthropod vectors. Future Microbiol. 2016; 11 (4): 549-566.
- 638 51. Kumsa B, Laroche M, Almeras L, Mediannikov O, Raoult D, Parola P.
639 Morphological, molecular and MALDI-TOF mass spectrometry identification of
640 ixodid tick species collected in Oromia, Ethiopia. Parasitol Res. 2016; 115 (11):
641 4199-4210.
- 642 52. Zurita A, Gutiérrez SG, Cutillas C. Infection Rates of *Wolbachia* sp. and
643 *Bartonella* sp. in Different Populations of Fleas. Curr Microbiol. 2016; 73 (5):
644 704-713.
- 645 53. Reis, C., Cote, M., Le, R.D. et al. (2011) Vector competence of the tick *Ixodes*
646 *ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. PLoS Negl Trop Dis, 5 (5):
647 e1186.

- 648 54. Bessas A, Leulmi H, Bitam I, Zaidi S, Ait-Oudhia K, Raoult D, et al. Molecular
649 evidence of vector-borne pathogens in dogs and cats and their ectoparasites in
650 Algiers, Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016; 45: 23-28.
- 651 55. Tay ST. *Wolbachia* endosymbionts, *Rickettsia felis* and *Bartonella* species, in
652 *Ctenocephalides felis* fleas in a tropical region. *J Vector Ecol.* 2013; 38 (1): 200-
653 202.
- 654 56. Oteo JA, Portillo A, Portero F, Zavala-Castro J, Venzal JM, Labruna MB.
655 ‘Candidatus *Rickettsia asemboensis*’ and *Wolbachia* spp. in *Ctenocephalides*
656 *felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador. *Parasit Vectors.*
657 2014; 30 (7): 455.
- 658 57. Gracia MJ, Marcén JM, Pinal R, Calvete C, Rodes D. Prevalence of *Rickettsia*
659 and *Bartonella* species in Spanish cats and their fleas. *J Vector Ecol.* 2015; 49
660 (2): 233–239.
- 661 58. Segoli M, Hoffman A, Lloyd J, Omodei G, Ritchie S. The effect of virus-
662 blocking *Wolbachia* on male competitiveness of the dengue vector mosquito,
663 *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: 3294.
- 664 59. Slatko BE, Luck AN, Dobson SL, Foster JM. *Wolbachia* endosymbionts and
665 human disease control. *Mol Biochem Parasitol.* 2014; 195 (2): 88-95.
- 666 60. Dittmar K, Whiting MF. New *Wolbachia* endosymbionts from nearctic and
667 neotropical fleas (Siphonaptera). *J Parasitol.* 2004; 90: 953-957.
- 668 61. La SB, Meconi S, Fenollar F, Rolain JM, Roux V, Raoult D. Emended
669 description of *Rickettsia felis* (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent
670 cultured bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52: 2035-2041.
- 671 62. Parola P. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of
672 fever in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 996-1000.

- 673 63. Keita AK, Socolovschi C, Ahuka-Mundeke S, Ratmanov P, Butel C, Ayoub A.
674 Molecular evidence for the presence of *Rickettsia felis* in the feces of wild living
675 African apes. PLoS One. 2013; 8: e54679.
- 676 64. Mediannikov O, Socolovschi C, Edouard S, Fenollar F, Mouffok N, Bassene H.
677 Common epidemiology of *Rickettsia felis* infection and malaria, Africa. Emerg
678 Infect Dis. 2013; 19 (11): 1775-1783.
- 679 65. Bernabeu-Wittel M, del Toro MD, Nogueras MM, Muniain MA, Cardeñosa N,
680 Márquez FJ. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and
681 *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. Eur J Clin
682 Microbiol Infect Dis. 2006; 25 (6): 375-381.
- 683 66. Brown LD, Macaluso KR. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne
684 Rickettsiosis. Curr Trop Med Rep. 2016; 3: 27-39.
- 685 67. Marion E, Deshayes C, Chauty A, Cassisa V, Tchibozo S, Cottin J, et al.
686 Detection of *Mycobacterium ulcerans* DNA in water bugs collected outside the
687 aquatic environment in Benin. Med Trop (Mars). 2011; 71 (2): 169-172.
- 688 68. Konan KL, Doannio JM, Coulibaly NG, Ekaza E, Marion E, Assé H, et al.
689 Detection of the IS2404 insertion sequence and ketoreductase produced by
690 *Mycobacterium ulcerans* in the aquatic Heteroptera in the health districts of
691 Dabou and Tiassalé in Côte d'Ivoire. Med Sante Trop. 2015; 25 (1): 44-51.
- 692 69. Lavender CJ, Fyfe JA, Azuolas J, Brown K, Evans RN, Ray LR, et al. Risk of
693 Buruli ulcer and detection of *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes in
694 southeastern Australia. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5 (9): e1305.
- 695 70. Kidd L, Maggi R, Diniz PP, Hegarty B, Tucker M, Breitschwerdt E. Evaluation
696 of conventional and realtime PCR assays for detection and differentiation of

- 697 Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. Vet Microbiol. 2008; 129(3-4):
698 294-303.
- 699 71. Guptill L. Feline bartonellosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2010; 40
700 (6): 1073-1090.
- 701 72. Chomel BB, Kasten RW, Williams C, Wey AC, Henn JB, Maggi R et al.
702 *Bartonella* endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and patients.
703 Ann N Y Acad Sci. 2009; 1166: 120-126.
- 704 73. Guptill L. Bartonellosis. Vet Microbiol. 2010; 140 (3-4): 347-359.
- 705 74. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR. Bartonellosis: an
706 emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human
707 beings. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio). 2010; 20 (1): 8-30.
- 708 75. Regier Y, O'Rourke F, Kempf VA. Erratum to: *Bartonella* spp. - a chance to
709 establish One Health concepts in veterinary and human medicine. Parasit
710 Vectors. 2016; 9 (1): 330.
- 711 76. Márquez FJ, Muniain MA, Rodríguez-Liebana JJ, Del Toro MD, Bernabeu-
712 Wittel M, et al. Incidence and distribution pattern of *Rickettsia felis* in
713 peridomestic fleas from Andalusia, southeast Spain. Ann Acad Sci NY. 2009;
714 1078: 344-346.
- 715 77. Abreu-Yanes E, Martin-Alonso A, Martin-Carrillo N, Livia KG, Marrero-
716 Gagliardi A, Valladares B, et al. *Bartonella* in Rodents and Ectoparasites in the
717 Canary Islands, Spain: New Insights into Host-Vector-Pathogen Relationships.
718 doi: 10.1007/s00248-017-1022-y.
- 719 78. Yssouf A, Almeras L, Terras J, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Detection of
720 *Rickettsia* spp in ticks by MALDITOF MS. PLoS Negl. Trop. Dis. 2015; 9:
721 e0003473.

722 79. Fotso Fotso A, Mediannikov O, Diatta G, Almeras L, Flaudrops C, Parola P, et
723 al. MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the
724 *Borrelia crocidurae/Ornithodoros sonrai* paradigm.

725

726 **Figure captions**

727 **Figure 1. Representative spectra from cephalothorax of *C. felis*, *P. irritans*, *S. t.***

728 ***tripectinata* and *N. fasciatus*.** a.u., arbitrary units; m/z, mass-to-charge ratio.

729 **Figure 2: ClinProTools™ Principal Component Analysis corresponding to**

730 **different fleas species infected or not by different *Bartonella* species.** A- Comparison

731 of *S. t. tripectinata* infected by *B. Quintana* and *S. t. tripectinata* control group. B-

732 Comparison of *S. t. tripectinata* infected by *B. henselae* and *S. t. tripectinata* control

733 group. C- Comparison of *S. t. tripectinata* infected by *B. elizabethae* and *S. t.*

734 *tripectinata* control group. D- Comparison of *N. fasciatus* infected by *B. henselae* and

735 *N. fasciatus* control group.

736 **Figure 3. Figure 4. A peak pattern for the specific detection of different *Bartonella***

737 **species in *S. t. tripectinata*** A-B, location of discriminating peak masses shared between

738 the spectra acquired from *S. t. tripectinata* infected by *B. quintana* and the spectra of *S.*

739 *t. tripectinata* control group. C-E, location of discriminating peak masses shared

740 between the spectra acquired from *S. t. tripectinata* infected by *B. henselae* and the

741 spectra of *S. t. tripectinata* control group.

742 **Figure 4. A peak pattern for the specific detection of *B. elizabethae* species in *S. t.***

743 ***tripectinata*.** A-E, location of discriminating peak masses shared between the spectra

744 acquired from *S. t. tripectinata* infected by *B. elizabethae* and the spectra of *S. t.*

745 *tripectinata* control group. a.u., arbitrary units; m/z, mass-to-charge ratio.

746 **Figure 5. Dendrogram constructed using 8 representative MS spectra of each flea**

747 **species studied in this work.**

748 **Table 1. Geographical origin, preservation method, date of collection and hosts of four different species of fleas used in this study.**

Species	Geographical area	Number of samples (male/female)	Preservation method	Date of collection	Host
<i>C. felis</i>	Seville (Spain)	6 (1/5)	96% Ethanol	May 2016	-
	Villamanique de la Condesa, Seville (Spain)	13 (3/10)	96% Ethanol	August 2014	<i>C. l. familiaris</i>
	Dos Hermanas, Seville (Spain)	12 (1/11)	96% Ethanol	January-June 2016	<i>C. l. familiaris</i>
	Sanlúcar de Barrameda, Cádiz (Spain)	21 (1/20)	70% Ethanol	March-September 2011	<i>C. l. familiaris</i>
<i>P. irritans</i>	Seville (Spain)	23 (10/13)	96% Ethanol	May 2016	-
<i>N. fasciatus</i>	Corse (France)	23 (5/18)*	70% Ethanol	January-June 2016	<i>Rattus</i> sp.
<i>S. t. tripectinata</i>	Corse (France)	22 (1/21)*	70% Ethanol	January-June 2016	<i>Rattus</i> sp., <i>Mus</i> sp., <i>Apodemus</i> sp.

749 (*) - Fleas collected and provided by colleagues in collaboration (See Acknowledgements).

750 **Table 2. Primers and probes references used for real-time quantitative and standard PCR in this study.**

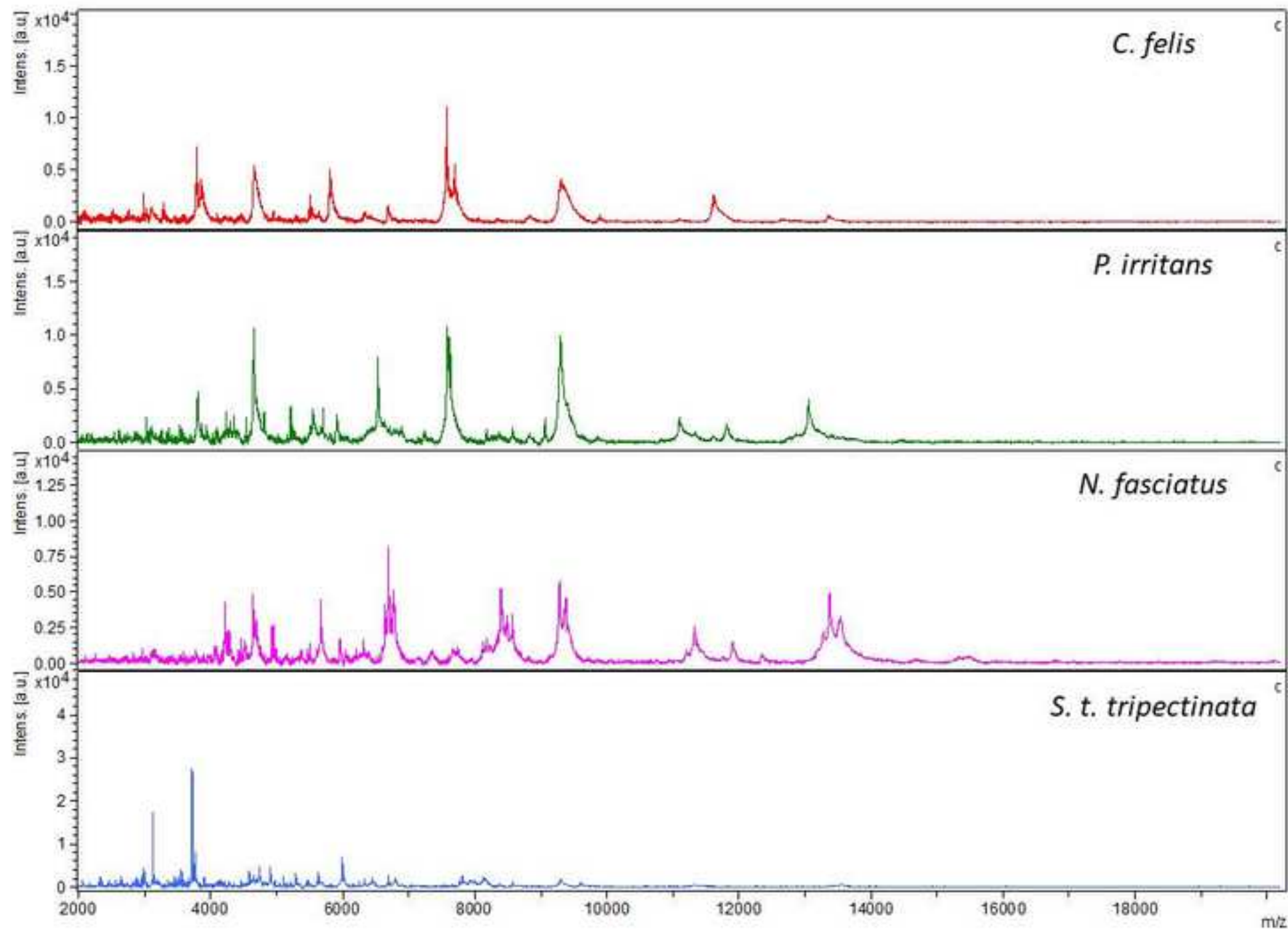
qPCR		
Microorganism	Targeted sequence	Reference
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	[35]
<i>R. felis</i>	<i>Phosphatase gene</i>	[36]
<i>R. typhi</i>	Hypothetical protein	[37]
<i>Bartonella</i> spp.	ITS2	[38]
<i>B. henselae</i>	<i>Pap31</i>	[39]
<i>B. quintana</i>	<i>yopP</i>	[40]
<i>Borrelia</i> spp.	ITS4	[41]
	16S	[42]
Anaplasmataceae spp.	23S	[43]
<i>Wolbachia</i> sp.	23S	Unpublished
<i>C. burnetti</i>	IS30A	[42]
	IS1111A	[44]
<i>Mycobacterium</i> spp.	ITS	[45]
Standard PCR		
<i>Bartonella</i> spp.	<i>gltA</i>	[46]
	ITS	[47]
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>rpoB</i>	[48]

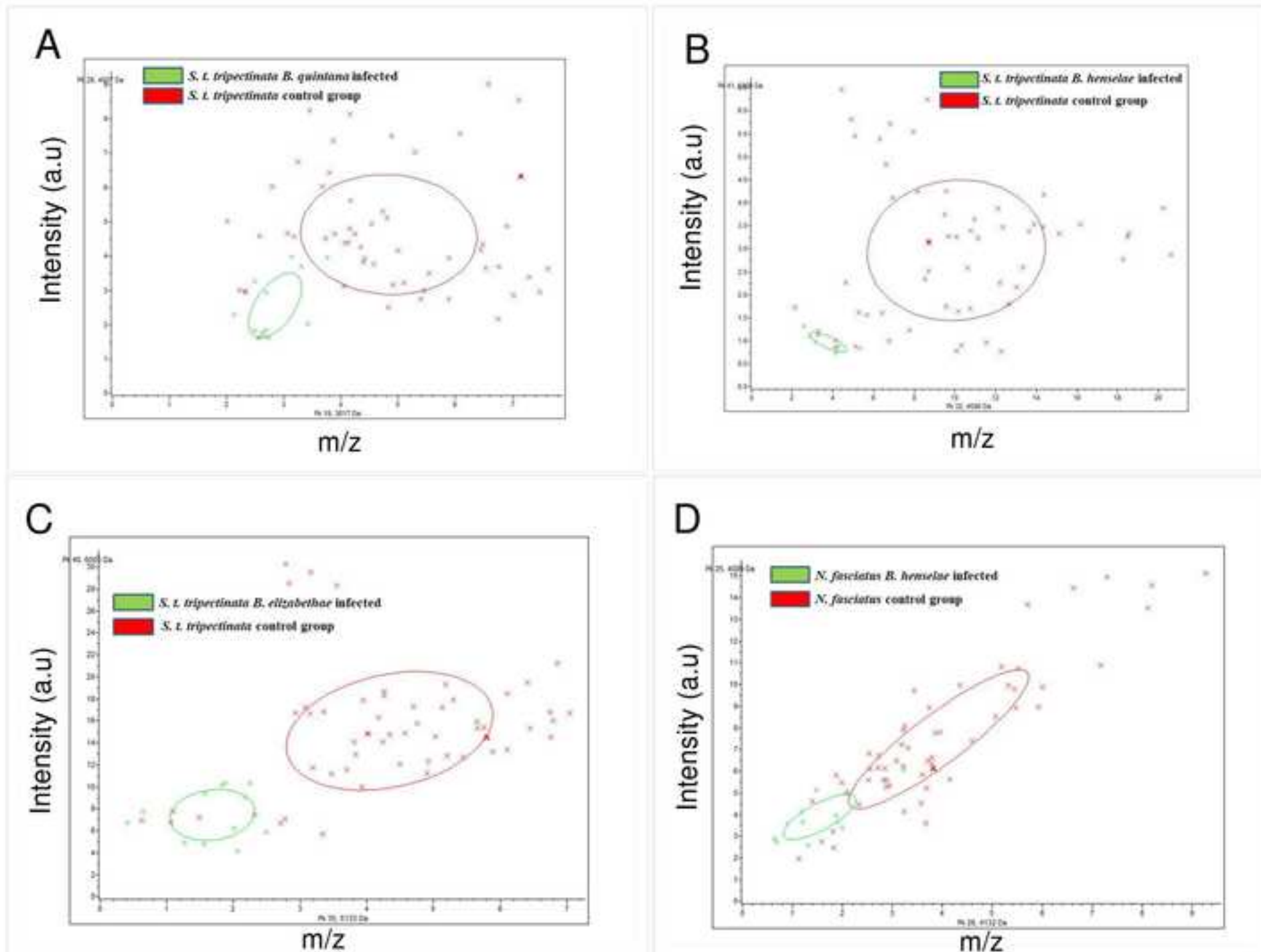
751

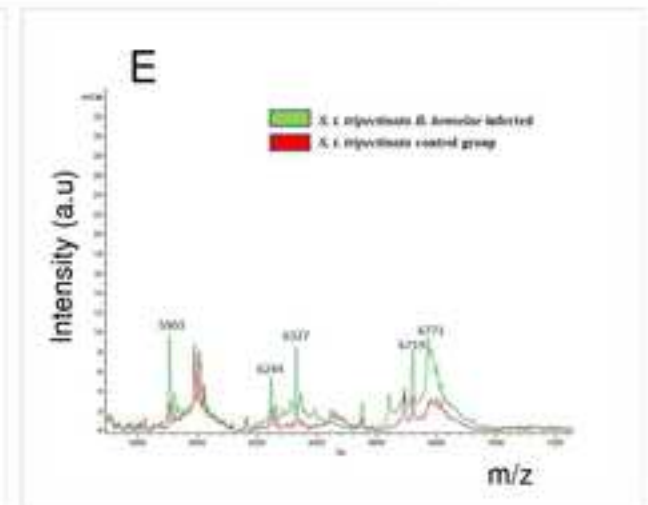
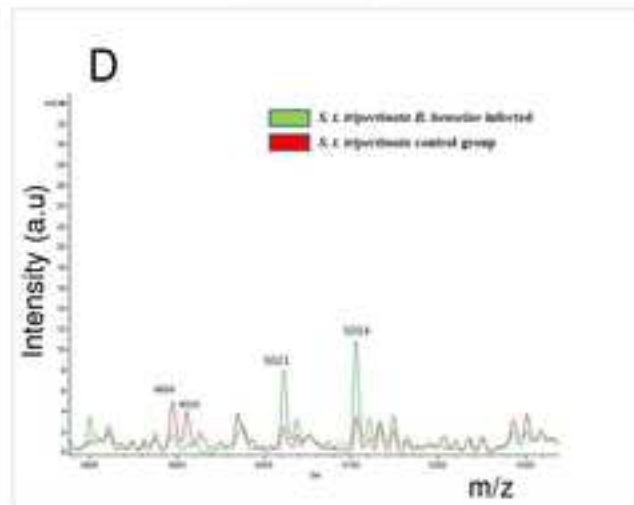
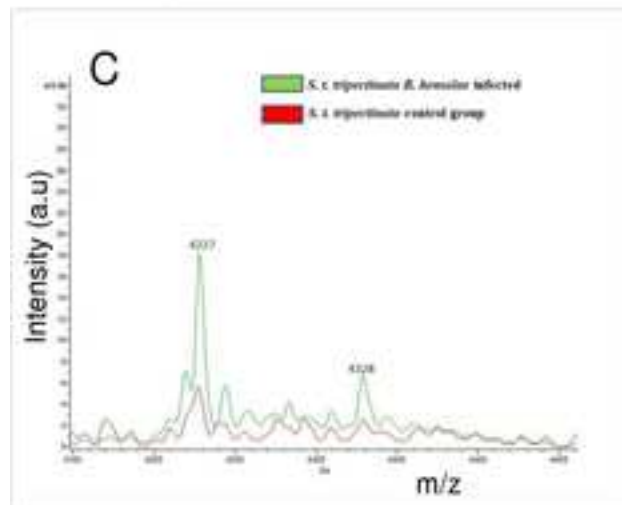
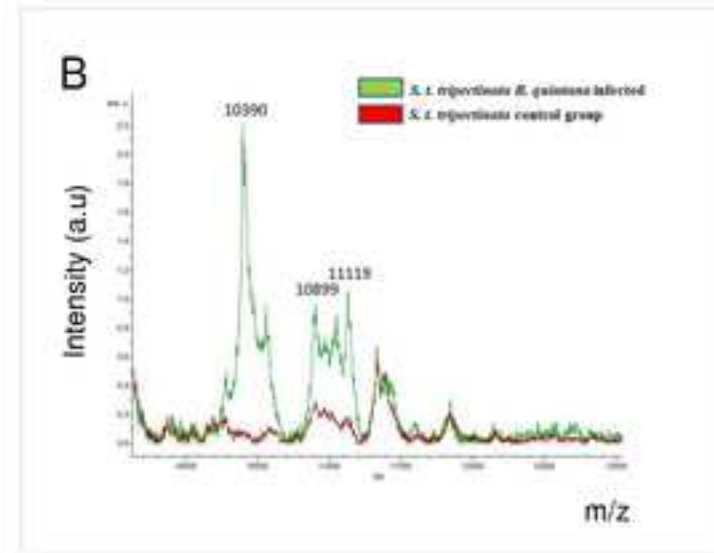
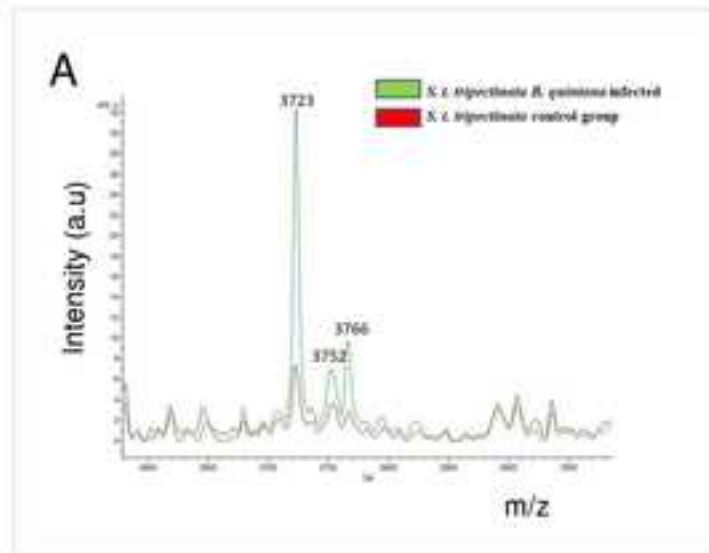
752 **Table 3. Percentage of pathogen-positive fleas detected by PCR.**

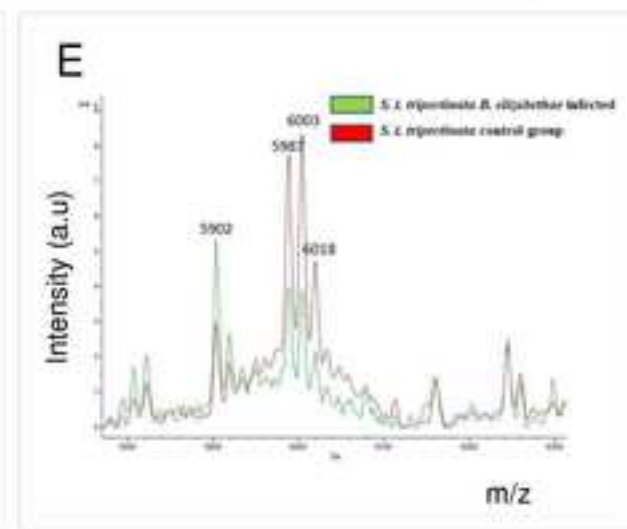
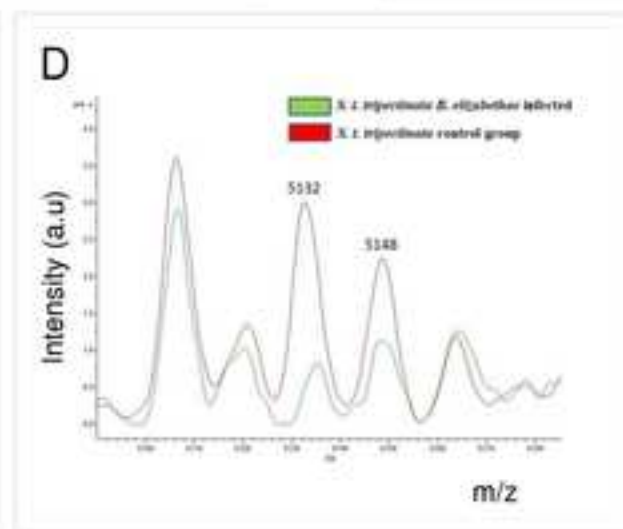
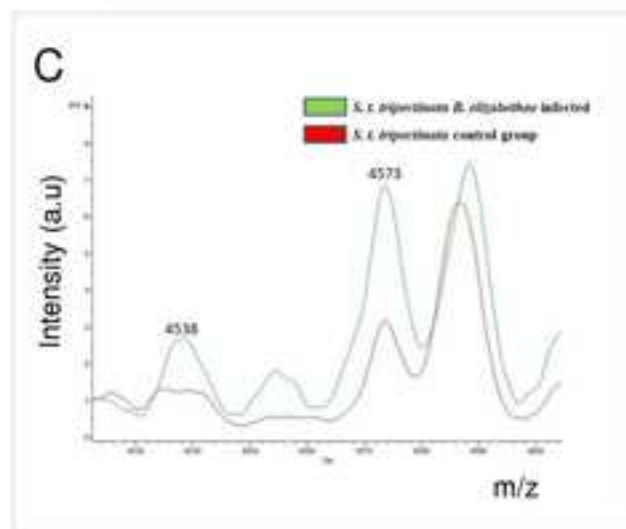
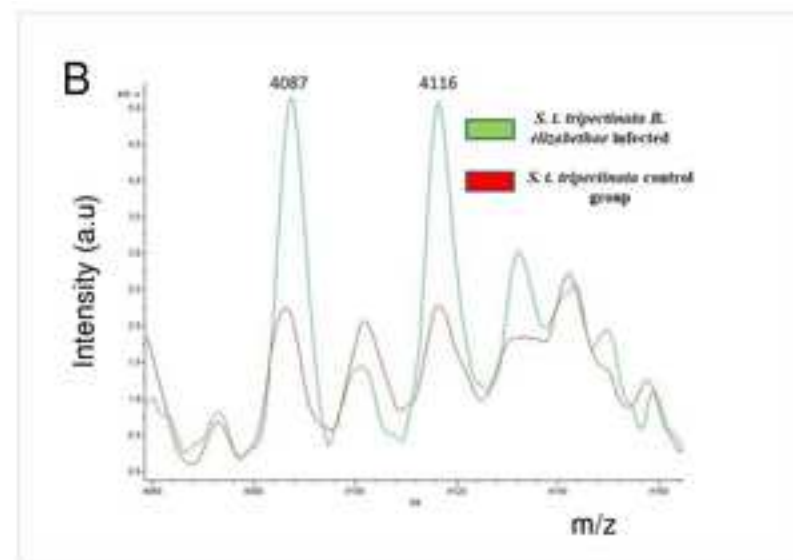
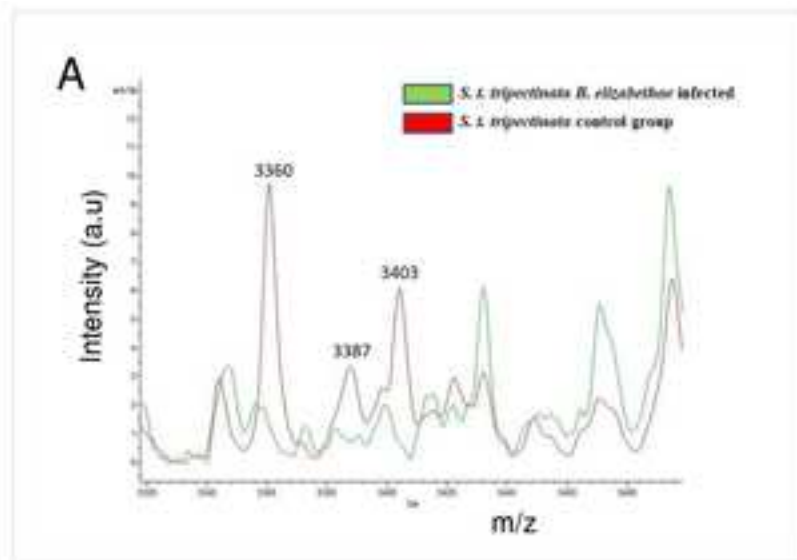
	Anaplasmataceae (Wolbachia spp.)	Rickettsia spp. (R. felis)	R. typhi	C. burnetti	Mycobacterium spp.	Borrelia spp.	Bartonella spp. (B. quintana, B. henselae, B. elizabethae)
C. felis	32/53(Wolbachia sp.) (60.4%)	15/53 (R. felis) (28.3%)	-	-	1/53 (2.0%)	-	-
P. irritans	22/23(Wolbachia sp.) (95.7%)	-	-	-	1/23 (4.3%)	-	2/23 (Bartonella spp.) (8.7%)
S. t. tripectinata	-	-	-	-	-	-	2/22(B. henselae) (9.1 %); 3/22 (B. quintana) (13.6 %) 3/22 (B. elizabethae) (13.6 %)
N. fasciatus	-	-	-	-	-	-	3/23 (B. henselae) (13.0 %); 1/23(B. elizabethae) (4.3 %) 3/23 (Bartonella spp.) (13.0 %)

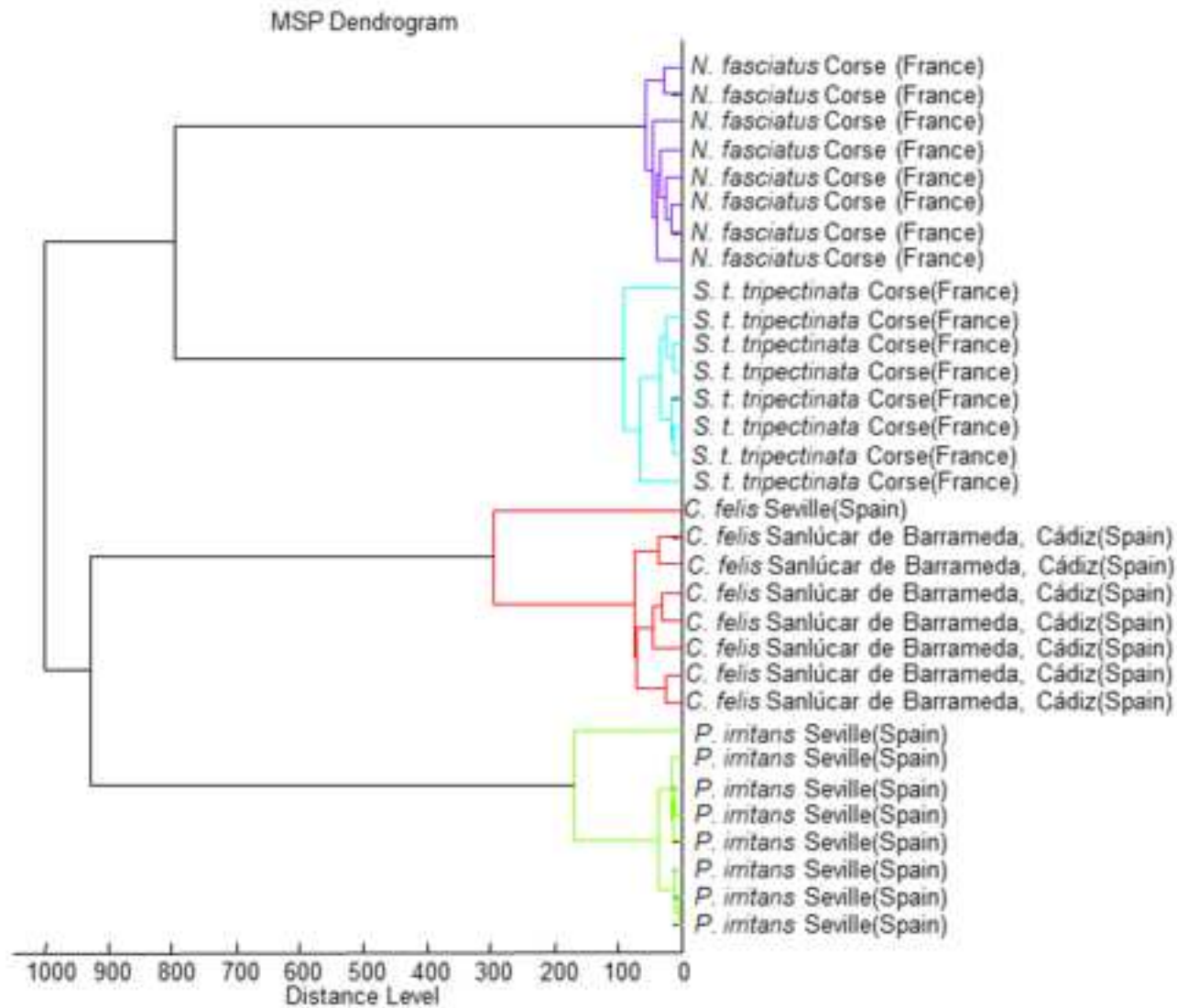
753 (-)- PCR performed but with negative results for all specimens tested.











Identification of cryptic species of the human flea, *Pulex irritans* (Siphonaptera:Pulicidae). Morphological, biometrical, molecular and phylogenetic characterization.

ANTONIO ZURITA¹, ROCÍO CALLEJÓN¹, MARA URDAPILLETA², MARCELA LARESCHI³, MANUEL DE ROJAS¹ & CRISTINA CUTILLAS¹

¹Department of Microbiology and Parasitology. Faculty of Pharmacy. University of Seville. Profesor García González 2, 41012 Seville, Spain.

²National Institute of Tropical Medicine (INMET). Neuquén y Jujuy s/n, 3370 Puerto Iguazú - Misiones, Argentina.

³Center of Parasitology and Vectors Studies (CEPAVE) (CONICET CCT La Plata-UNPL). Bv 120 s/n e/ 60 y 64, 1900 La plata, Argentina.

* Corresponding author:

Dr. Cristina Cutillas

Department of Microbiology and Parasitology. Faculty of Pharmacy. University of Seville. Prof. García González 2, 41012 Seville, Spain.

Phone: +34954556773

e-mail: cutillas@us.es

Introduction

Within Siphonaptera Order, Pulicidae family has remained as the most studied family over the world since most fleas of medical or veterinary importance, such as *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans* or *Xenopsylla cheopis*, are members of this family. Currently, Pulicidae consists of four tribes, 21 genera, and 167 species. Some authors (Lewis, 1998) considered Pulicidae as including Tungidae; however, Whiting et al. (2008) placed this family as a monophyletic group and phylogenetically distant from Tungidae. Recently, Krasnov et al. (2015) placed Pulicidae family in the basis of the flea phylogeny together with Leptopsyllidae. These authors suggested that the mainly Palearctic distribution and origin of these basal flea families and the mainly Nearctic distribution of the most derived family Ceratophyllidae, indicates an eastward earlier (pre-glaciation) migrations from Palearctic to Nearctic areas through the Bering Land Bridge. On the other hand, Pulicidae exhibit an interesting diversity of host specificity patterns and ecological habits (Whiting et al., 2008). Within this family, the so-called human flea, *P. irritans* Linnaeus, 1758 (the earliest flea species described) has been the most studied species together with *C. felis* Bouché, 1835, since they have a cosmopolitan distribution together with the fact that these species are closely related with humans. *P. irritans* parasitizes a wide variety of hosts, including rodents or birds (Graham et al., 2016); however, it generally parasitizes large wild and domestic mammals, particularly carnivores, livestock and humans (Gratz, 1999). Furthermore, specific host associations vary between geographic regions (Hopla, 1980; Lewis et al., 1988). Thus, in the last years several authors have assessed the role of this species as a vector of several diseases carrying out epidemiological studies based on the detection and prevalence of certain pathogens such as *Yersinia pestis*, *Rickettsia felis* or *Bartonella* sp. in *P. irritans*

collected from different hosts and different geographical areas (Belthoff et al., 2015; Fontalvo et al., 2017; Palomar et al., 2017). According to Yssouf et al. (2014) the rapid and reliable identification of fleas at species level is an essential component of the fight against flea borne diseases in order to establish epidemiological relationship between flea species and their borne zoonotic agents. Thus, before to assess the prevalence of certain pathogens in fleas it is needed to know accurately which species we are studying in order to establish appropriate prevention and control strategies.

During the last fifteen years, molecular approaches has contributed to significant data about genus and species diagnostic determination of fleas (Dittmar & Whiting, 2003; Vobis et al., 2004; Gamerschlag et al., 2008; Whiting et al., 2008; Marrugal et al., 2013; Zurita et al., 2016). Nevertheless, update the specific differentiation of fleas is generally based on a variety of morphological criteria such as the shape and structure of their complex genitalia or the distribution of setae, spines and ctenidia (Linardi & Santos, 2012; López Berrizbeitia et al., 2016; Hastriter et al., 2017). The combination of molecular and morpho-biomerical data has allowed to find synonymies or cryptic species on fleas. In this sense, recently, Zurita et al. (2018a) based on a comparative morphological, phylogenetic and molecular study of *Nosopsyllus fasciatus* and *Nosopsyllus barbarus*, concluded that there were no solid arguments to consider these two "morphospecies" as two different species and proposed *N. barbarus* as a junior synonym of *N. fasciatus*. Other authors (Zurita et al., 2015) revealed the existence of two geographic genetic lineages within *Stenoponia tripectinata tripectinata* isolated from rodents: The Canary Islands and the Iberian Peninsula. These authors based their study on the Internal Transcribed Spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2), 18S ribosomal RNA partial gene and cytochrome c-oxidase 1 (*coxI*) mitochondrial DNA partial gene sequences. These studies reveal the existence of a genetic plasticity in the Order

Siphonaptera which should be taken into account in order to carry out further taxonomic studies.

On the other hand, because of morphological specializations, highly promiscuous fleas species such as *P. irritans* or *C. felis* which occurs on a wide variety of Carnivora, could show high levels of genetic variability especially when we assess populations which parasitize different host or they are settled in different geographical areas. It has been suggested that host specificity may influence the level of intraspecific genetic divergence since more generalist parasite species will show a higher level of intraspecific genetic variation enabling them to infest a broader host range (van der Mescht et al., 2015). This fact has been recently demonstrated by Lawrence et al. (2014) and Zurita et al. (2016) who found five different *cox1* haplotypes of *C. felis* collected from different geographical origins.

The main aim of this work was to carry out a comparative morphological, biometrical and molecular study of two different populations of *P. irritans* (Spain and Argentina). For this purpose, the ITS1, ITS2 of the rDNA and partial *cox1* and cytochrome b (*cytb*) mtDNA gene of these taxa were sequenced in order to clarify their taxonomic status and to assess intraspecific and intrapopulation similarity in order to investigate host-dependent differences in the human flea in a defined geographical area. Furthermore, based on the sequences obtained and those of additional flea species retrieved from public databases, we also carried out a comparative phylogenetic analysis in order to investigate the existence of different geographical lineages or cryptic species within *P. irritans*.

Materials and methods

Collection of samples

Fifty-five fleas from Seville (southwestern of Spain) were collected from an abandoned horse stable with a flea infestation. On the other hand, thirty-three fleas isolated from Andean foxes (*Lycalopex culpaeus*) and South American gray foxes (*Lycalopex griseus*) from Santa Cruz (south of Argentina) were obtained through the assistance of colleagues (see Acknowledgements). Fleas obtained were kept in Eppendorf tubes with 70 % ethanol until required for subsequent identification and sequencing.

Morphological identification

Flea specimens collected by us (Spain) were classified by ourselves whereas those fleas provided by our colleagues were classified firstly by them (see Acknowledgements) and then morphologically compared with our specimens in our laboratory. For morphological analysis, whole specimens were examined under optical microscope. (flea legs were cut off in order to carry out the posterior DNA extraction). For this purpose, fleas preserved in vials with 70 % ethanol were cleared with KOH, dehydrated in a growing series of alcohol, diaphanized in eugenol and mounted on permanent slides in Canada balsam for their detailed examination under optic microscope. Photographs were taken by using a Microscope Olympus BX51 equipped with Photographic Camera Olympus DP71. Diagnostic morphological characters of *P. irritans* were studied by comparing with figures, keys and descriptions given in Hopkins & Rothschild (1953), Barrera (1955), Smit (1958) and Beaucournu & Launay (1990). Thus, the morphological characteristics cited by these authors have been considered for the specific determination including:

- Anterior margin of head smoothly rounded and without a tubercle.
- Vestigial genal comb which may or may not be present. Pronotal comb always absent.
- Club of antenna asymmetrical.

- Presence of three strong setae on the head (Genal, pre-ocular and post-antennal).
- Row of small spines inside of hind coxa near apex, consisting of 8-12 spines in females and 7-10 spines in males forming a patch.
- Sternite VII of females with a sinus and with 4/5 setae on each side. Spermatheca with bulga subglobular, rather small and hilla longer than bulga.
- Male specimens show a clasper with process 1 very large and completely covering processes 2 and 3. The crochet appeared expanded apically and the dorsal aedeagal sclerite relatively long and slender.

After morphological identification, ten specimens from Argentina (seven females and three males) and fourteen specimens from Spain (six males and eighth females) were measured according to fifteen different parameters (Table 2). Descriptive univariate statistics (arithmetic means, standard deviations, and variation coefficients) for all parameters were determined for two populations (Spain and Argentina) using IBM® SPSS® Statistics program version 24.0.0.0 (Pardo & Ruiz, 2002).

Molecular study

Total DNA was extracted from fleas using flea legs by the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Then, genomic DNA was checked using an electrophoresis in 0.8 % agarose gel electrophoresis infused with ethidium bromide.

All molecular markers sequenced in this study (ITS1 and ITS2 rDNA, *cox1* and *cytb* mtDNA) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a thermal cycler (Eppendorf AG). PCR mix, PCR conditions and PCR primers are summarized in Table S1. The ITS1, ITS2, *cox1* and *cytb* partial gene sequences obtained from *P. irritans* from the two geographical areas were deposited in GenBank database (Table 1). In

order to compare with Pulicidae species, we analysed the sequences of ITS1 and ITS2 rDNA of *C. felis* available in Genbank and it were sequenced and provided *cox1* and *cytb* sequences of *C. felis* isolated from dogs (*Canis lupus familiaris*) from La Plata (Argentina) (Table 1).

The PCR products were checked on ethidium bromide stained 2 % Tris–Borate–EDTA (TBE) agarose gels. Bands were eluted and purified from the agarose gel by using the QWizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega). Once purified, the products were sequenced by Stab Vida (Portugal). To obtain a nucleotide sequence alignment file, we used MUSCLE alignment method (Edgar, 2004) by the MEGA program version 5.2 (Tamura et al., 2011). The ITS1 rDNA intraindividual variation was determined by sequencing four to seven clones of two specimens from Spain and one specimen from Argentina. The PCR products were eluted from the agarose gel using the WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and transformation was carried out as cited by Cutillas et al. (2009). Plasmids were purified using a Wizard Plus SV (Promega) and sequenced by Stab Vida (Portugal) with an universal primer (M13).

A restriction map of the *cox1* sequences of *P. irritans* from Spain and Argentina was constructed using The Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000; available at http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html) in order to identify certain endonucleases which could discriminate between both geographical origins by PCR-linked random-fragment-length polymorphism (RFLP).

In order to assess the similarity among all marker sequences of *P. irritans* obtained in this study and other Pulicidae species, we analyzed the number of base differences per sequence from between sequences studied using no. of differences method of MEGA 5

program version 5.2 (Tamura et al., 2011). The program DOTMATCHER from the European Molecular Biology Open Software Suite package (Rice et al., 2000) was used to find repeats within the ITS1 sequences.

Phylogenetic trees were inferred using nucleotide data and performed using two methods: Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inferences (B). Maximum Likelihood trees were generated using the PHYML package from Guindon & Gascuel (2003), whereas Bayesian inferences were generated using Mr Bayes-3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). JMODELTEST (Posada 2008) program was used to determine the best-fit substitution model for the parasite data (ITS2, *cox1* and *cytb*). Models of evolution were chosen for subsequent analyses according to the Akaike Information Criterion (Huelsenbeck & Rannala 1997; Posada & Buckley, 2004). For the study of the dataset containing the concatenation of three markers (ITS2, *cox1* and *cytb*), analyses based on BI were partitioned by gene and models for individual genes within partitions were those selected by jModeltest. For ML inference, best-fit nucleotide substitution models included general time-reversible model with gamma-distributed rate variation GTR+G (ITS2) and general time-reversible model with gamma-distributed rate variation and a proportion of invariable sites, GTR+I+G (*cox1* and *cytb*). Support for the topology was examined using bootstrapping (heuristic option) (Felsenstein 1985) over 1000 replications to assess the relative reliability of clades. The commands used in MrBayes-3.2.6 for BI were nst=6 with invgamma rates (*cox1* and *cytb*) and nst=6 with gamma rates (ITS2). For BI, the standard deviation of split frequencies was used to assess if the number of generations completed was sufficient; the chain was sampled every 500 generations and each dataset was run for 10 million generations. Adequacy of sampling and run convergence were assessed using the effective sample size diagnostic in TRACER program version 1.6 (Rambaut & Drummond, 2007). Trees from the first

million generations were discarded based on an assessment of convergence. Burn-in was determined empirically by examination of the log likelihood values of the chains. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) are percentage converted.

The phylogenetic analyses, based on ITS2, *cox1* and *cytb* mtDNA sequences were carried out using our sequences and those obtained from GenBank database (appendix 1). Phylogenetic trees based on ITS2, *cox1*, *cytb* mtDNA and concatenated (ITS2, *cox1* and *cytb*) sequences were rooted including outgroup species representing members of the Order Mecoptera: *Panorpa meridionalis*. This choice was based on the the combination of morphological and molecular data obtained in former studies which provided compelling evidences for a sister group relationship between Mecoptera and Siphonaptera (Whiting, 2002; Whiting et al., 2008). ITS1 sequence of *Panorpa meridionalis* or other species of Mecoptera was not available neither by amplification of different individuals nor in any public database. Thus, no phylogenetic tree with other Siphonaptera species based on ITS1 sequences was constructed, as well as this molecular marker was discarded for the concatenated dataset. The selection of flea taxa for the concatenated phylogenetic tree was limited to flea species whose ITS2, *cox1* and *cytb* sequences were available on GenBank database.

NETWORK (v5.0.0.1) was used to create inter-population median-joining networks (Bandelt et al., 1999; available at <http://www.fluxus-engineering.com>), to visualize the evolutionary relationships between *cox1* and *cytb* haplotypes. This approach has been shown to yield the best-resolved genealogies relative to other rooting and network procedures (Cassens et al., 2003).

Results

Morphological and biometrical results

Specific morphological identification carried out in our lab was in agreement with those made by our colleagues. Thus, all specimens showed specific morphological characteristics of *P. irritans* (Figs. 1a-i). Neither morphological diagnostic characters nor biometrical data (Table 2) showed significant differences between specimens from both geographical origins. Nevertheless, specimens from Spain appeared with eight biometrical parameters higher than those from Argentina (Table 2).

Molecular results

Internal Transcribed Spacer 1 and 2 (ITS1 and ITS2) analysis

The length of the ITS1 sequences of *P. irritans* from Spain ranged from 876 to 968 bp whereas ITS1 sequences of specimens from Argentina were 796 bp in length (Table 1). This length difference was also observed in clones from individuals from the two different geographical origins. A search for repeats resulted in repetitive sequences within the ITS1 sequence of population from Spain. The repeat units was of 86 bp in length and are tandemly arranged within the ITS1 spacer of Spain specimens (Fig. 2). This unit exists three times and twice within the ITS1 sequence of *P. irritans* from Spain (specimens with a ITS1 sequence length of 962 bp and 876 bp, respectively), whereas these repeat units were observed only once in ITS1 sequences of *P. irritans* collected from Argentina (796 bp) (Fig. 2). ITS1 intra-individual similarity studied in 11 clones of two individuals of *P. irritans* from Spain ranged from 99.3 % to 100 % whereas this value ranged from 99.2 % to 100 % when five clones of one individual of *P. irritans* from Argentina were compared (Data not shown). Specimens obtained from Argentina showed the same ITS1 sequence (Intrapopulation similarity = 100 %), whereas this value ranged from 99.5 % to 100 % for individuals collected from Spain (Table 3). On the other hand, when the ITS1 sequences of individuals from different

geographical origins were compared, the similarity observed ranged from 95.9-99.9 corresponding the high value when comparing *P. irritans* from Iran and Spain and the lowest value when comparing *P. irritans* from United States and Spain (Table 3). The similarity observed between *P. irritans* from Argentina and Iran ranged from 93.9 % to 96.3 % (Intraspecific similarity) (Table 3). Furthermore, we observed high values of intraspecific similarity among specimens collected from Spain, Cameroon and Iran whereas these values were quite lower when we compared these specimens with those collected from United States and Argentina (Table 3).

ITS2 sequence length ranged from 322 bp (*P. irritans* from Spain) to 324 bp (*P. irritans* from Argentina) (Table 1). Likewise ITS1 sequences, the intrapopulation similarity of ITS2 sequences of *P. irritans* from Argentina was 100 %, however, this value ranged from 99.7 % to 100 % for *P. irritans* obtained from Seville. On the other hand, the intraspecific similarity observed ranged from 98.2 % to 98.5 % (Table not shown)

Phylogenetic tree inferred from ITS2 sequences of *P. irritans* and other ITS2 sequences retrieved from GenBank (see appendix 1) showed Pulicidae species form a monophyletic group clustered together with high bootstrap and BPP values (100/100). Within Pulicidae clade, *P. irritans* specimens comprised a well-supported group (100/100) where individuals collected from Spain clustered together (Bootstrap and BPP values: 100/99) and separated from *P. irritans* from Argentina (Fig.- S1).

Partial *CoxI* mtDNA gene analysis

The partial *coxI* mtDNA gene sequences of *P. irritans* from the two geographical areas were 658 bp in length (Table 1). When *coxI* sequences of *P. irritans* collected from Argentina were analyzed, three different haplotypes were obtained (H1, H2, H3) (Intra-population similarity observed ranged from 99.3 % to 99.7 %). On the other hand, three

different haplotypes were observed when *cox1* sequences of *P. irritans* from Spain were assessed (H4, H5, H6) (Intrapopulation similarity ranged from 99.7 % to 99.8 %). Intraspecific similarity observed between individuals from both geographical origins ranged from 91.5 % to 92 % (Table 4).

Phylogenetic tree topology revealed a highly supported clade (Bootstrap and BPP values: 90/98) clustering all Pulicidae species (Fig. S2). Within this clade, *P. irritans* species appeared clustering together (Bootstrap and BPP values: 100/100) and near to *Echidnophaga* species with high bootstrap and BPP support. Within clade comprised by *P. irritans* specimens, two high supported subclades were observed. The first one was comprised by specimens from Argentina, whereas in the second one, specimens from New Zealand and Spain clustered together (Fig. S2).

Based on *cox1* sequences, restriction mapping identified many endonucleases that could be used to delineate the different geographical haplotypes found in this study. Thus, *AfaI*, *AfIII*, *BfrI*, and *HpaII* sites were present in the sequences of *P. irritans* from Argentina haplotypes H1, H2 and H3 but not in *P. irritans* haplotypes H4, H5 and H6 (Spain). Nevertheless, *BglIII*, *DraI* and *HincII* presented one restriction site in *cox1* haplotypes from Spain but not in those from Argentina.

Partial *Cytb* mtDNA gene analysis

The length of the partial *cytb* mtDNA gene sequences of *P. irritans* from Argentina and Spain was 374 bp (Table 1). Seven haplotypes of *P. irritans* from Argentina were obtained (H1-H7) (Intrapopulation similarity ranged from 97.8 % to 99.7 %), while this value ranged from 99.7 % to 100 % for specimens collected from Spain, where only two different haplotypes were observed (H8 and H9) (Table 5). Intraspecific similarity ranged from 90.9 % to 92.2 % (Table 5). The phylogenetic tree inferred from partial

cytb gene sequences revealed a monophyletic origin of Pulicidae with highly moderated support (Bootstrap and BPP values: 70/77). In addition, within Pulicidae, all *P. irritans* specimens appeared clustered and separated from the remaining Pulicidae species. Likewise *cox1* phylogenetic tree, within *P. irritans* clade two highly supported subclades corresponding with both geographical origins were noticed (Fig. S3).

The network of the *cytb* sequences of *P. irritans* populations showed a general congruence with the phylogenetic reconstruction. Thus, the minimum spanning network showed the two clearly divergent groups of variants. Populations maybe clearly separated on the basis of their geographical location (Argentina and Spain). The genetic divergence corresponds with 30-39 mutational steps between both populations (Fig. 3). The general topology of the network showed an structure with the most haplotypes from Argentina, nevertheless, population from Spain present a mayoritary haplotype (H8) including all individuals except one individual corresponding with a different haplotype (H9) (Fig. 3). Furthermore, H2 represent the most recent common ancestral haplotype from *P. irritans*. Argentinian haplotypes were more closely related to each other (1-8 mutational steps) than to any Spaniard haplotype (Fig. 3).

The concatenated dataset of ITS2, partial *cytb* and *cox1* gene sequences included 1,406 aligned sites and 41 taxa, including outgroups. Phylogenetic analyses of the concatenated dataset yielded a tree with branches strongly supported (Figure 4). The analysis based on the concatenated dataset is concordant with all trees constructed on the basis of the single markers. Thus, all species belonging to Pulicidae family presented a monophyletic origin. Furthermore, within *P. irritans* clade we noticed two highly supported subclades based on two geographical origins (Spain and Argentina).

Discussion

Some flea species from different families have cosmopolitan or, at least very broad distribution. The most famous (and the most important from the medical and veterinary points of views) cosmopolitan fleas are several pulicids (*P. irritans*, *X. cheopis*, *C. felis*, *C. canis*), Ceratophyllids (*Nosopsyllus consimilis*, *N. fasciatus*) and one leptosyllid (*Leptopsylla segnis*) (Krasnov, 2008). Ubiquitous distribution of these species is related to dispersal via humans, their livestock, pets and commensals (mice and rats). Nevertheless, the origin of any of these fleas is not uniform. Instead, they are distributed in patches which are characterized by the host and environmental conditions that are favourable for each given species (Beaucournu & Pascal, 1998). For example, although it is accepted that the Pulicidae family originates in Palearctic región (Krasnov et al., 2015), the origin of *P. irritans* has been placed in South America for several authors (Traub, 1980; Buckland & Sadler, 1989; Beaucournu et al., 1993; Zhu et al., 2015). This species had been introduced to the Old World by the Vikings (Rothschild, 1973; Buckland & Sadler, 1989) and/or through ancient cultural contacts between Japan and Ecuador (Traub, 1980).

The present work represents the first study that provides morphological, biometrical, molecular and phylogenetic comparative data of *P. irritans* isolated from South America and Europe in order to assess taxonomic and phylogenetic relationships between both populations and to shed light on the systematics and origins of *P. irritans* representing a new tool to elucidate identifications within this flea species. Classically, the major obstacle in flea phylogenetics has been their extreme morphological specializations associated with ectoparasitism, and the inability of systematists to homologize characters adequately across flea and outgroup taxa (Whiting et al., 2008). Fleas appear to have many instances of parallel evolution of morphology (via both structural losses and modifications), probably associated with multiple invasions of

similar hosts, which further obscures homology (Holland, 1964). In this sense Marrugal et al. (2013) observed morphological differences in different populations of *C. felis* which did not correspond with molecular differences. Nevertheless, in our study neither morphological data nor biometrical data showed significant differences between *P. irritans* specimens from Spain and Argentina, even in this case, when these two populations were collected from different hosts. Morphological and biometrical results did not correspond with molecular and phylogenetic ones which showed a high degree of nucleotide divergence between both geographical origins. Our results disagree with Krasnov et al. (2015) who support the idea that the process of host selection by fleas is determined by reciprocal relationships between host traits and flea traits. In other words, flea species with similar traits, independent of their phylogenetic affinities, were found on the same host species more often than expected by chance from the entire pool of flea species.

The ribosomal DNA segments Internal Transcribed Spacer 1 and 2 (ITS1 and 2) have been shown to be two of the best molecular markers for analysing genetic relationships and to establish phylogenetic relationships at the species level in arthropods (Marcilla et al., 2002; de Rojas et al., 2007; Monje et al., 2013; Zagoskin et al., 2014). The value of a spacer for phylogenetic studies on the level of species or populations can be different for different species (Von der Schulenburg et al. 2001; Platas et al. 2001). The ITS2 rDNA is in some genera like *Drosophila* more conservative than the ITS1; other genus, for example, *Gonatocerus* (Hymenoptera), do not show significant sequence variability of the ITS1 but a high variability within the ITS2 (Schlötterer et al. 1994; de Leon et al., 2004). This dual pattern keeps in fleas where in some genera as *Ctenocephalides* or *Archaeopsylla* the ITS2 showed a higher molecular variability than ITS1, whereas, in *Nosopsyllus* sp. was the opposite (Zurita et al., 2016; Zurita et al., 2018a, b).

Furthermore, ITS evolution seems to be shaped by internal repetition, leading to ITS1 size variation and increase the variability factor. This repetition includes repetitive elements with comparatively long repeat units, e.g. in trematodes (Platyhelminthes) and dipterans and coleopterans (Tang et al., 1996; van Herwerden et al., 1998; Gouliamova et al., 1998; Harris & Crandall, 2000; Von der Schulenburg et al. 2001; Warberg et al. 2005). In this work we observed that ITS2 sequences of *P. irritans* were markedly shorter than ITS1 sequences, which has already been noticed in other flea species such as *C. felis*, *Stenoponia tripectinata tripectinata*, *C. canis* and *N. fasciatus* (Vobis et al., 2004, Zurita et al., 2015; Zurita et al., 2016 and Zurita et al., 2018a). Furthermore, the ITS1 rDNA regions revealed a considerable length variation between both geographical population caused by a long repetitive region of 86 bp length which appeared three times and twice in specimens collected from Spain. Internal repeats in the ITS spacers are not unusual and have been frequently described. Depending on their length, they have also been named mini- or microsatellites (den Bakker et al. 2004). This fact have already noticed by Gamerschlag et al. (2008) who reported the existence of length differences between the ITS1 rDNA of the African and the South American *T. penetrans* populations caused by the number of repeats of a repetitive region of 99 bp. Furthermore, these authors detected repetitive sequences within the ITS1 rDNA region of other flea species such as *C. felis*, *Echidnophaga gallinacea*, *P. irritans*, *Spilopsyllus cuniculi*, and *X. cheopis* claiming that these repetitive elements could serve as a valuable tool for phylogeographic studies. Nevertheless, in contrast to Vobis et al. (2004), Gamerschlag et al. (2008), Marrugal et al. (2013) and Zurita et al. (2015) who not observed great ITS sequences differences among different populations of *C. felis*, *C. canis*, *T. penetrans* and *S. t. tripectinata* (Intraspecific similarity always higher than 99 %) we found high values of intraspecific variation between both geographical

populations in *P. irritans*, especially at level of ITS1 sequences (Intraspecific similarity ranged from 95.9 % to 96.3 %). The existence of two genetic lineages (Spain and Argentina) was corroborated by ITS2 phylogenetic tree, thus both populations clustered separately based on their geographical origin. Furthermore, when ITS1 sequences of different specimens of *P. irritans* isolated from different geographical areas were compared the highest values of nucleotide divergence were observed in specimens from Nearctic and Neotropical areas, whereas almost no differences were observed among individuals from Palearctic and Afrotropical regions (Table 3). These data could reinforce the idea that this species has an American origin since ancestral populations exhibit higher genetic diversity values compared to recent populations that have expanded into novel territories (Savolainen et al., 2002).

MtDNA markers such as *cox1* and *cytb* are frequently used to evaluate genetic diversity, cryptic species and population structure of invertebrates (Brinkerhoff et al., 2011; Scheffers et al., 2012; Dantas-Torres et al., 2013; Callejón et al., 2015). In this sense both markers have been used in flea studies in the last fifteen years with several purposes: In order to assess the phylogeographic structure of certain populations (Dittmar & Whiting, 2003), to study the phylogenetic diversity of some species (Lawrence et al., 2014), to carry out a molecular characterization of certain species (Zurita et al., 2015; Zurita et al., 2016) or even for the reconstruction of ancestral host affiliation and biogeographic history of fleas (Zhu et al., 2015). Since Hebert et al. (2003) proposed the three percent interspecific limit of *cox1* in the case of species delimitation for insect, this marker turned into the marker of choice for barcoding studies of arthropods, enabling identification of cryptic species diversification (Hebert et al., 2004). Therefore, a 658 bp fragment of *cox1* can be used as a DNA barcode to identify and distinguish between animal species (Hebert et al. 2004; Ward et al. 2005).

In our study we amplified this region showing a low value of intraspecific similarity within *P. irritans* from Spain and Argentina (91.5 % - 92 %), in contrast to the high values of similarity observed for specimens from the same population (> 99 %). Zurita et al. (2016) observed values of similarity of 97 % between two flea congeneric species (*C. felis* and *C. canis*) collected from different geographical areas, whereas Zurita et al. (2018a) obtained a minimum interspecific similarity of 95 % when they compared *N. barbarus* and *N. fasciatus cox1* sequences from different geographical origins. Historically, DNA barcoding studies on insects and invertebrates have shown maximum intraspecific variation ranging from 3 to 3.9 % (Carew et al. 2007). This high degree of polymorphism for intraspecific analysis could be explained attending to wide geographical localities where the samples were collected. Indeed, in certain groups, such as amphibians, when several individuals of a species they come from distant geographical regions, intraspecific variation can exceed the interspecific variation observed between species of the same genus, making it difficult for the delimitation of species with only the sequence of *cox1* (Vences et al. 2005). However, in our study, *cytb* sequence analysis confirmed this high degree of nucleotide divergence between Argentinean and Spaniard populations of *P. irritans*. Although we observed a similar percentage of intrapopulation similarity in both geographical origins (bit lower in Argentina) based on *cytb*, we noticed higher nucleotide variability in Argentina than in Spain with the existence of a higher number of haplotypes. In this case intraspecific similarity observed (90 % to 92.2 %) were similar or even lower than those observed between two different congeneric species such as *C. felis* and *C. canis* (90.6 %) or *Xenopsylla skrjabini* and *Xenopsylla conformis* (92.5 %) (Table 5). These high degrees of mtDNA intraspecific variability could be explained by the fact that generalist flea shows considerably more intraspecific genetic variation than host-specific flea species. For a generalist parasite,

greater levels of genetic variability can provide evolutionary potential for local host race formation (Gómez-Díaz et al., 2007). Previous examples have been reported for ticks and lice parasitizing sympatric hosts (McCoy et al. 2001; Johnson et al. 2002). For this reason, we analyzed the *cox1* and *cytb* intraspecific similarity between Spaniard and Argentinean populations of another generalist flea like *C. felis* but we did surprisingly not observed sequences differences between them. *Cox1*, *cytb* and concatenated phylogenetic trees reinforced the idea of the existence of two geographical genetic lineages within *P. irritans*. Thus, *cox1* phylogenetic tree showed specimens collected from Spain and New Zealand clustered together in the same clade separated from individuals collected from Argentina. These results show no significant host dependent sequence differences since some specimens from Spain and New Zealand were collected parasitizing different hosts (see appendix 1). Likewise *cox1*, *cytb* and concatenated phylogenetic trees showed two well supported subclades within *P. irritans* based on geographical origins. Our results disagrees with Zhu et al. (2015) and Zurita et al. (2018b) who noticed the close phylogenetic relationship between *Ctenocephalides* and *Archaeopsylla* genera within Pulicidae including both genera in Archaeopsyllini subfamily. Nevertheless, our phylogenetic results showed *Archaeopsylla* genus clustering together with different sister genus depending on the marker of choice. In addition, in congruence with phylogenetic results based on *cytb* mtDNA sequences, network showed the two clearly divergent groups of variants corresponding with different geographical location (Argentina and Spain). The general topology of the network showed the most haplotypes with an Argentinian origin, nevertheless, population from Spain present a main haplotype including all individuals except one corresponding with a different haplotype. Furthermore, H2 represent the most recent common ancestral haplotype from *P. irritans*. All these results could reinforce the idea

suggested by Buckland & Sadler (1989) that *P. irritans*, in contrast with other human ectoparasites, could have a South American origin reaching Western Palearctic area through Beringian and Asiatic routes, at any time during the Postglacial. This fact together with a reproductive isolation, could have originated the existence of two cryptic species within *P. irritans*.

In conclusion, the present study provides for the first time, comparative morphological, biometrical and molecular data of *P. irritans* collected from Spain and Argentina (Palearctic and Neotropical areas). On the basis of morphological and biometrical results, we did not find differences between both populations, even though they were collected from different hosts. Thus, we could suggest *P. irritans*, in contrast to other generalist fleas, maintain a certain degree of morphological similarity, at least between Western Palearctic and Neotropical areas. On the other hand, based on molecular and phylogenetic data obtained in this work we provided the existence of two well defined geographical genetic lineages within *P. irritans* species suggesting the existence of two cryptic species which could be discriminated by PCR-linked RFLP. Furthermore we suggest a South American origin for this species since this continent held the most ancient population which showed a higher genetic diversity compared to European, African, Oceanian and Asian populations. However, more taxonomic, phylogenetic and phylogeographic studies of this species parasitizing different hosts from different geographical areas are needed in order to confirm these hypothesis. It is intriguing to realize that we know essentially nothing about the origin, evolution and population structure of *P. irritans* elsewhere in spite of its medical global importance as well as it is important to understand the underlying genetic structure of a vector because it provides insights into the threat of a parasitic infestation (Dittmar & Whiting, 2003). Therefore, this work attempts to elucidate important questions refer to *P. irritans* origin, taxonomy

and phylogeny mixing by the first time morphological, biometrical, molecular, phylogenetic and phylogeographic? tools.

Acknowledgement

The present work was supported by a grant of the V Plan Propio de Investigación of the University of Seville, Spain. The authors thank Alejandro Travani of the Research Center of Puerto Deseado (UNPA-CONICET, Argentina) and Alejandro Rodríguez of the Biological Conservation Department of Doñana-CSIC station, Seville, Spain for providing samples from Santa Cruz (Argentina).

References

Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48.

Barrera, A. (1955) Las especies Mexicanas del género *Pulex* Linnaeus (Siph, Pulicidae). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 8: 219–236.

Beaucournu, J.C. & Launay, H. (1990) Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental, Faune de France, Vol. 76. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris.

Beaucournu, J.C., Le Piver, M. & Guiguen, C. (1993) The present status of the conquest of tropical Africa by *Pulex irritans* Linnaeus, 1758. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, 86: 290-294.

Beaucournu, J.C. & Pascal, M. (1998) Origine biogeographique de *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc, 1800) (Siphonaptera-Ceratophyllidae) et observations sur son hote primitif. *Biogeographica*, 74, 132–135.

Belthoff, J.R., Bernhardt, S.A., Ball, C.L., Gregg, M., Johnson, D.H., Ketterling, R., Price, E. & Tinker, J.K. (2015) Burrowing Owls, *Pulex irritans*, and Plague. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 15: 556–64.

Brinkerhoff, R.J., Martin, A.P., Jones, R.T. & Collinge, S.K. (2011) Population genetic structure of the prairie dog flea and plague vector, *Oropsylla hirsuta*. *Parasitology*, 138: 71–79.

Buckland, P.C. & Sadler, J.P. (1989) A biogeography of the human flea, *Pulex irritans* L. (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Biogeography*, 16: 115–120.

Callejón, R., Gutiérrez-Avilés, L., Halajian, A., Zurita, A., de Rojas, M. & Cutillas, C. (2015) Taxonomy and phylogeny of *Trichuris globulosa* Von Linstow, 1901 from camels. A review of *Trichuris* species parasitizing herbivorous. *Infection, genetics and evolution*, 34: 61–74.

Carew, M.E., Pettigrove, V., Cox, R.L. y Hoffmann, A.A. (2007) DNA identification of urban *Tanytarsini chironomids* (Diptera: Chironomidae). *Journal of the North American Benthological Society*, 26: 587–600.

Cassens, I., Van Waerebeek, K., Best, P.B., Crespo, E.A., Reyes, J. & Milinkovitch, M.C. (2003) The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Molecular Ecology*, 12: 1781–1792.

Cutillas, C., Callejón, R., de Rojas, M., Tewes, B., Ubeda, J.M., Ariza, C. & Guevara, D.C. (2009) *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica*, 111: 299–307.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A. & Otranto, D. (2013) Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors*, 6: 213.

de Leon, J.H., Jones, W.A. & Morgan, D.J. (2004) Molecular distinction between populations of *Gonatocerus morrilli*, egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter from Texas and California: do cryptic species exist. *Journal of Insect Science*, 4: 39.

de Rojas, M., Ubeda J.M., Cutillas, C., Mora, M.D., Ariza, C. & Guevara, D. (2007) Utility of ITS1-5.8S-ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the *Rhinonyssus coniventris* species complex (Acari: Rhinonyssidae). *Parasitology Research*, 100: 1041–1046.

den Bakker, H.C., Gravendeel, B. & Kyper, D.W. (2004) An ITS phylogeny of *Leccinum* and an analysis of the evolution of minisatellite-like sequences within ITS1. *Mycologia*, 95: 102–118.

Dittmar, K. & Whiting, M.F. (2003) Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (*CytB* and *CoII*). *Parasitology Research*, 91: 55–59.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–1797.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 3: 294–299.

Fontalvo, M.C., Favacho, A.R.M., Araujo, A.C., Santos, N.M.D., Oliveira, G.M.B., Aguiar, D.M., Lemos, E.R.S. & Horta, M.C. (2017) *Bartonella* species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21: 290–296.

Gamerschlag, S., Mehlhorn, H., Heukelbach, J., Feldmeier, H. & D’Haese, J. (2008) Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). *Parasitology Research*, 102: 193–199.

Gasser, R.B., Nansen, P. & Guldberg, P. (1996) Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Molecular Cellular Probes*, 10: 99–105.

Gómez-Díaz, E., González-Solís, J., Peinado, M.A. & Page, R.D.M. (2007) Lack of host-dependent genetic structure in ectoparasites of *Calonectris* shearwaters. *Molecular Ecology*, 16: 5204–15.

Gouliamova, D.E., Hennebert, G.L., Smith, M.T. & van der Walt, J.P. (1998) Diversity and affinities among species and strains of *Lipomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74: 283–291.

Graham, C.B., Eisen, R.J. & Belthoff, J.R. (2016) Detecting Burrowing Owl Bloodmeals in *Pulex irritans* (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Medical Entomology*, 53: 446–50.

Gratz, N. G. 1999. Rodent reservoirs and flea vectors of natural foci of plague, pp. 63–96. In D. T. Dennis, K. L. Gage, N. Gratz, J. D. Poland, and E. Tikhomirov (eds.), *Plague manual: Epidemiology, distribution, surveillance and control*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696–704.

Harris, D.J. & Crandall, K.A. (2000) Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and micro satellite studies. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 284–291.

Hastriter, M.W., Miller, K.B., Svenson, G.J., Martin, G.J. & Whiting, M.F. (2017) New record of a phoretic flea associated with earwigs (*Dermaptera, Arixeniidae*) and a redescription of the bat flea *Lagaropsylla signata* (*Siphonaptera, Ischnopsyllidae*). *ZooKeys*, 657: 67–69.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & De Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270: 313–321.

Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 14812–14817.

Holland, G.P. (1964) Evolution, classification, and host relationships of Siphonaptera. *Annual Review of Entomology*, 9: 123–146.

Hopkins, G.H.E. & Rothschild, M. (1953) An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. I. Tungidae and Pulicidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hopla, C. E. 1980. A study of the host associations and zoogeography of *Pulex*, pp. 185–207. In R. Traub and H. Starcke (eds.), In Proceedings, International Conference o

Lewis, R. E., J. H. Lewis, and C. Maser. 1988. The fleas of the Pacific Northwest. Oregon State University Press, Corvallis, OR. Fleas, 1977, Peterborough, UK. A.A. Balkema, Rotterdam.

Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, 276: 227–232.

Johnson, K.P., Williams, B.L., Drown, D.M., Adams, R.J. & Clayton, D.H. (2002) The population genetics of host specificity: genetic differentiation in dove lice (Insecta: Phthiraptera). *Molecular Ecology*, 11: 25–38.

Krasnov, B.R. (2008) Functional and Evolutionary Ecology of Fleas. Cambridge University Press, New York (United States of America).

Krasnov, B.R., Shenbrot, G. & Khokhlova, I.S. (2015) Historical biogeography of fleas: the former Bering Land Bridge and phylogenetic dissimilarity between the Nearctic and Palearctic assemblages. *Parasitology Research*, 114: 1677–86.

Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, M. & Slapeta, J. (2014) High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology*, 28: 330–336.

Lewis, R.E. (1998) Resume of the Siphonaptera (Insecta) of the World. *Journal of Medical Entomology*, 35: 377–389.

Linardi, P.M. & Santos, J.L.C. (2012) *Ctenocephalides felis felis* vs *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera:Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 4, 345–354.

- López Berrizbeitia, M.F., Hastriter, M.W. & Díaz, M.M. (2016) A New Flea Species of the Genus *Cleopsylla* (Siphonaptera: Stephanocircidae) from Northwestern Argentina. *The Journal of Parasitology*, 102: 514–519.
- Luchetti, A., Trentini, M., Pampiglone, S., Fiorawanti, M.L. & Mantovani, B. (2007) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) and fleas across South America and Africa. *Parasitology Research*, 100: 593–598.
- Marcilla, A., Bargues, M.D., Abad-Franch, F., Panzera, F., Carcavallo, R.U., Noireau, F., Galvão, C., Jurberg, J., Miles, M.A., Dujardin, J.P. & Mas-Coma, S. (2002) Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infections, genetics and evolution*, 1: 225–235.
- Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research*, 112: 2289–2298.
- McCoy KD, Bouliner T, Tirard C, Michalakis Y. (2001) Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 395–405.
- Monje, L.D., Quiroga, M., Manzoli, D., Couri, M.S., Silvestri, L., Venzal, J.M., Cuervo, P. & Beldomenico, P.M. (2013) Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from *Philornis seguyi* (García, 1952) and *Philornis torquans* (Nielsen, 1913) (Diptera: Muscidae). *Systematic Parasitology*, 86: 41–53.

- Palomar, A.M., Cevidanes, A., Portillo, A., Kalema-Zikusoka, G., Chirife, A.D., Romero, L., Muro, J., Mugisha, L., Oteo, J.A. & Millán, J. (2017) High Prevalence of *Rickettsia* spp. in Dog Fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in Rural Uganda. *Journal of Medical Entomology*, 54: 1076–1079.
- Pardo, A. & Ruiz, M.A. (2002) SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Madrid, McGraw-Hill.
- Platas, G., Acero, J., Borkowski, J.A., Gonzalez, V., Portal, M.A., Rubio, V., Sanchez-Ballesteros, J., Salazar, O. & Pelaez, F. (2001) Presence of a simple tandem repeat in the ITS1 region of the Xylariales. *Current Microbiology*, 43: 43–50.
- Posada, D. & Buckley, T.R. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53: 793–808.
- Posada, D. (2008) Jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- Rambaut, A. & Drummond, A. (2007) Tracer v1.6. Available online at <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16: 276–277.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- Rothschild, M. (1973) Report on a femal *Pulex irritans* in a tenth century Viking pit. *Proceedings of the Royal Society of London*, 38: 29.

Savolainen, P., Zhang, Y.P., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298: 1610–1613.

Scheffers, B.R., Joppa, L.N., Pimm, S.L. & Laurance, W.F. (2012) What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 27: 501–510.

Schlötterer, C., Hauser, M.T., von Haeseler, A. & Tautz, D. (1994) Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 513–522.

Smit, F.G.A.M. (1958) A preliminary note on the occurrence of *Pulex irritans* and *Pulex simulans* baker in North America. *The Journal of Parasitology*, 44: 523–526.

Stothard, P. (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28: 1102–1104.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.

Tang, J., Toe, L., Back, C. & Unnasch, T.R. (1996) Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 244–252.

Traub, R. (1980) The zoogeography and evolution of some fleas, lice and mammals. – In: Traub, R. and Starke, H. (eds), Fleas. Proc. Int. Conf. on fleas, Ashton Wold, Peterborough, UK, June 1977. A. A. Balkema, pp. 93–172.

Van der Mescht, L., Matthee, S. & Matthee, C.A. (2015) Comparative phylogeography between two generalist flea species reveal a complex interaction between parasite life history and host vicariance: parasite-host association matters. *BMC Evolutionary Biology*, 15: 105.

van Herwerden, L., Blair, D. & Agatsuma, T. (1998) Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology*, 116: 311–317.

Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. & Vieites, D.R. (2005) Comparative Performance of the 16S rRNA Gene in DNA Barcoding of Amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2: 5.

Vobis, M., D'Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagburn, B.L., Bond, R., Denholm, I., Dryden, M.W., Payne, P., Rust, M.K., Schroeder, I., Vaughn, M.B. & Bledsoe, D. (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, 94: 219–226.

Von der Schulenburg, J.H., Hancock, J.M., Pagnamenta, A., Sloggett, J.J., Majerus, M.E. & Hurst, G.D. (2001) Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Molecular Biology and Evolution*, 18: 648–660.

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. & Hebert, P.D. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360: 1847–1857.

Warberg, R., Jensen, K.T. & Frydenberg, J. (2005) Repetitive sequences in the ITS1 region of ribosomal DNA in congeneric microphallid species (Trematoda: Digenea). *Parasitology Research*, 97: 420–423.

Whiting, M.F. (2002) Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica Scripta*, 31: 93–104.

Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W. & Dittmar, K. (2008) A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*, 24: 677–707.

Yssouf, A., Socolovschi, C., Leulmi, H., Kernif, T., Bitam, I., Audoly, G., Almeras, L., Raoult, D. & Parola, P. (2014) Identification of flea species using MALDITOF/MS. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37: 153–157.

Zagoskin, M.V., Lazareva, V.I., Grishanin, A.K. & Mukha, D.V. (2014) Phylogenetic information content of Copepoda ribosomal DNA repeat units: ITS1 and ITS2 impact. *BioMed Research International*, ID: 926342.

Zhu, Q., Hastriter, M.W., Whiting, M.F. & Dittmar, K. (2015) Fleas (Siphonaptera) are Cretaceous, and evolved with Theria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 90: 129–139.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M., Gómez-López, M.S. & Cutillas, C. (2015) Molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny. *Bulletin of Entomological Research*, 104: 704–711.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. & Cutillas, C. (2016) *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*: introgressive hybridization?. *Systematic Entomology*, 41: 567–579.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M. & Cutillas, C. (2018a) Morphological and molecular study of the genus *Nosopsyllus* (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *Nosopsyllus barbarus* (Jordan & Rothschild 1912) as a junior synonym of *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc, d'Antic 1800). *Insect Systematic and Evolution*, 49: 81–101.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M. & Cutillas, C. (2018b) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Archaeopsylla erinacei* (Bouché, 1835) *Bulletin of Entomological Research*, doi: 10.1017/S0007485317001274.

Figure captions

Figure 1. Morphological specific characteristics of *Pulex irritans*. a- Head with a vestigial genal comb; b- Club of antenna; c- Genal, pre-ocular and post-antennal setae of head; d- Sternite VII of females; e- Spermatheca of females; f- Row of small spines inside of hind coxa of females; g- Row of small spines inside of hind coxa of males; h- Clasper of males, P1 (Process 1), P2 (Process 2) and P3 (Process 3); i- Crochet of males (cr) expanded apically and dorsal aedeagal sclerite (das) of males long and slender.

Figure 2. Alignment of the parcial ITS1 rDNA sequences of *Pulex irritans* from Spain and Argentina. In red and bold type the 86 bp repeat unit. Gaps generated by alignment (en dash).

Figure 3. A minimum spanning network constructed using 20 haplotypes of mitochondrial *cytb* partial gene sequences of *Pulex irritans*. The sizes of the circles are proportional to the number of haplotypes represented and the numbers correspond to the

mutational steps observed between haplotypes. H1 (2): *P. irritans* from Argentina; H2 (3): *P. irritans* from Argentina; H3 (1): *P. irritans* from Argentina; H4 (1) *P. irritans* from Argentina; H5 (1): *P. irritans* from Argentina; H6 (1): *P. irritans* from Argentina; H7 (1): *P. irritans* from Argentina; H8 (10): *P. irritans* from Spain; H9 (1): *P. irritans* from Spain.

Figure 4. Phylogenetic tree of *Pulex irritans* from different geographical origins (see Table 1) based on concatenated Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2), partial cytochrome c-oxidase 1 (*coxI*) and cytochrome b (*cytb*) gene of mitochondrial DNA inferred using the Bayesian (B) and Maximum Likelihood (ML) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown on the branches. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) are percentage converted.

Figure S1. Phylogenetic tree of *Pulex irritans* from different geographical origins (see Table 1) based on the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) sequences using the Bayesian (B) and Maximum Likelihood (ML) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown on the branches (B/ML). Bootstrap values lower than 60 % are not shown. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) is percentage converted.

Figure S2. Phylogenetic tree of *Pulex irritans* from different geographical origins (see Table 1) based on partial cytochrome c-oxidase 1 (*coxI*) gene of mitochondrial DNA sequences using the Bayesian (B) and Maximum Likelihood (ML) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown on the branches

(B/ML). Bootstrap values lower than 60 % are not shown. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) is percentage converted.

Figure S3. Phylogenetic tree of *Pulex irritans* from different geographical origins (see Table 1) based on partial cytochrome b (*cytb*) gene of mitochondrial DNA using the Bayesian (B) and Maximum Likelihood (ML) methods and Bayesian topology. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown on the branches (B/ML). Bootstrap values lower than 60 % are not shown. The Bayesian Posterior Probabilities (BPP) is percentage converted.

Table 1. GenBank accession numbers of ITS1, ITS2 and partial *cytb*, *cox1* gene sequences of individuals of *P. irritans* and *C. felis* obtained in this study.

ITS1					
Location/Country/Sample ID	Species/Gender	Host	Number of fleas	Base pairs (bp)	Accession number
Seville/Spain/PI1	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	962	LT797452
Seville/Spain/PI1 (Clone 3)	<i>P. irritans</i>	-	-	968	LT853871
Seville/Spain/PI1 (Clone 1-2, 4)	<i>P. irritans</i>	-	-	968	LT853872
Seville/Spain/PI2	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	876	LT797453
Seville/Spain/PI4	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	876	LT797454
Seville/Spain/PI4 (Clone 2)	<i>P. irritans</i>	-	-	882	LT853866
Seville/Spain/PI4 (Clone 3)	<i>P. irritans</i>	-	-	882	LT853867
Seville/Spain/PI4 (Clone 5)	<i>P. irritans</i>	-	-	882	LT853869
Seville/Spain/PI4 (Clone 6-7)	<i>P. irritans</i>	-	-	881	LT853868
Seville/Spain/PI4 (Clone 4, 8)	<i>P. irritans</i>	-	-	882	LT853870
Seville/Spain/PI5	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	876	LT797455
Seville/Spain/PI6	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	962	LT797456
Seville/Spain/PI7	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	876	LT797457
Seville/Spain/PI8	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	876	LT797458
Seville/Spain/PI10	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	876	LT797459
Seville/Spain/PI11	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	876	LT797460
Seville/Spain/PI12	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	962	LT797461
Seville/Spain/PI13	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	876	LT797462
Seville/Spain/PI14	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	876	LT797463
Santa Cruz/Argentina/ PI26-35	<i>P. irritans</i> /6♂ 5♀	<i>L. culpaeus</i> and <i>L. griseus</i>	10	796	LT797464
Santa Cruz/Argentina/PI32 (Clone 1)	<i>P. irritans</i>	<i>L. culpaeus</i> and <i>L. griseus</i>	-	796	LT853873
Santa Cruz/Argentina/PI32 (Clone 3)	<i>P. irritans</i>	<i>L. culpaeus</i> and <i>L. griseus</i>	-	796	LT853874
Santa Cruz/Argentina/PI32 (Clone 2, 6, 8)	<i>P. irritans</i>	<i>L. culpaeus</i> and <i>L. griseus</i>	-	796	LT853875
ITS2					
Location/Country/Sample ID	Species/Gender	Host	Number of fleas	Base pairs (bp)	Accession number
Seville/Spain/PI1	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	322	LT797448
Seville/Spain/PI6	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	322	LT797449
Seville/Spain/ PI2,4,5,7,8,10-14	<i>P. irritans</i> /3♂ 7♀	-	10	322	LT797450
Santa Cruz/Argentina/ PI26-35	<i>P. irritans</i> /6♂ 5♀	<i>L. culpaeus</i> and <i>L. griseus</i>	10	324	LT797451
La Plata/Argentina/668, 670	<i>C. felis</i> /2♀	<i>Canis lupus familiaris</i>	2	327	LT853876
CoxI					
Location/Country/ID	Species/Gender	Host	Number of fleas	Base pairs (bp)	Accession number/Haplo type
Seville/Spain/PI2	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	658	LT797468/H4
Seville/Spain/PI6	<i>P. irritans</i> /1♂	-	1	658	LT797469/H5
Seville/Spain/PI1, 4-5, 7-8, 10-14	<i>P. irritans</i> /4♂ 6♀	-	10	658	LT797470/H6
Santa Cruz/Argentina/ PI30	<i>P. irritans</i> /1♀	<i>L. culpaeus</i>	1	658	LT797465/H1
Santa Cruz/Argentina/ PI33	<i>P. irritans</i> /1♂	<i>L. griseus</i>	1	658	LT797466/H2
Santa Cruz/Argentina/ PI26, 27, 35	<i>P. irritans</i> /3♀	<i>L. culpaeus</i>	3	658	LT797467/H3
La Plata/Argentina/668	<i>C. felis</i> /2♀	<i>Canis lupus familiaris</i>	2	601	LT853879
Cytb					
Location/Country/ID	Species/Gender	Host	Number of fleas	Base pairs (bp)	Accession number/Haplo type
Seville/Spain/PI2	<i>P. irritans</i> /1♀	-	1	374	LT797473/H9
Seville/Spain/PI1, PI4-8, PI10-11, PI13-14	<i>P. irritans</i> /4♂ 6♀	-	10	374	LT797474/H8
Santa Cruz/Argentina/PI26, PI32	<i>P. irritans</i> /2♀	<i>L. culpaeus</i>	2	374	LT797475/H1
Santa Cruz/Argentina/PI27, PI29, PI35	<i>P. irritans</i> /3♀	<i>L. culpaeus</i>	3	374	LT797476/H2
Santa Cruz/Argentina/ PI28	<i>P. irritans</i> /1♀	<i>L. culpaeus</i>	1	374	LT797477/H3
Santa Cruz/Argentina/ PI30	<i>P. irritans</i> /1♀	<i>L. culpaeus</i>	1	374	LT797478/H4
Santa Cruz/Argentina/ PI31	<i>P. irritans</i> /1♀	<i>L. culpaeus</i>	1	374	LT797479/H5
Santa Cruz/Argentina/ PI33	<i>P. irritans</i> /1♂	<i>L. griseus</i>	1	374	LT797480/H6
Santa Cruz/Argentina/ PI34	<i>P. irritans</i> /1♀	<i>L. culpaeus</i>	1	374	LT797481/H7
La Plata/Argentina/668, 670	<i>C. felis</i> /2♀	<i>Canis lupus familiaris</i>	2	374	LT853878

	<i>Pulex irritans</i> (Spain)					<i>Pulex irritans</i> (Argentina)				
	MIN	MAX	X	$\bar{\sigma}$	VC	MIN	MAX	X	$\bar{\sigma}$	VC
TLF(mm)	1.8	2.1	1.9	0.1	5	1.7	2.5	2.1	0.2	9
TLM(mm)	1.3	2.1	1.8	0.3	17	1.4	1.8	1.6	0.2	12
TWF(mm)	1.1	1.2	1.1	0.1	9	1.0	1.3	1.1	0.1	9
TWM(mm)	0.8	1.2	1.0	0.2	20	0.7	0.9	0.8	0.1	12
HLF(μm)	398	597	458	40	8	352	469	416	38	9
HLM(μm)	380	498	418	47	11	322	387	354	46	13
HWF(μm)	234	293	259	25	9	205	264	237	22	9
HWM(μm)	205	293	250	32	12	176	234	205	41	20
EL(μm)	82	147	119	21	17	70	147	110	26	23
EW(μm)	53	59	57	3	5	47	64	57	6	10
CRL(μm)	26	40	34	5	14	28	33	30	4	13
DASL(μm)	82	110	97	10	10	80	94	87	10	11
PROL(μm)	87	152	111	16	14	70	137	100	24	24
MESL(μm)	106	167	135	19	14	88	152	124	25	20
METL(μm)	134	182	162	15	9	100	182	145	24	16

Table 2. TLF = total female length, TLM = total male length, TWF = total female width, TWM = total male width, HLF = total length of the female head, HLM = total length of the male head, HWF = total width of the female head, HWM = total width of the male head, EL = total length of the spermatheca, EW = total width of the spermatheca, CRL = total length of the extended region of the crochet, DASL = total length of the dorsal aedeagal sclerite, PROL= total length of the prothorax, MESL = total length of the mesothorax, METL = total length of the metathorax, MAX = maximum, MIN = minimum, $\bar{\sigma}$ = standard deviation. X =arithmetic mean, VC = variation coefficient (percentage converted).

Table 3 Intraspecific similarity observed among all the ITS1 sequences of *Pulex irritans* from different geographical areas obtained in this work and other from GenBank database. Values are given in percentages.

ITS1	<i>P. irritans</i> from Spain LT797452- LT797463	<i>P. irritans</i> from Argentina LT797464	<i>P. irritans</i> from United States GQ387496. Host unknown	<i>P. irritans</i> from Cameroon EU169198. Human host	<i>P. irritans</i> from Iran KX822017. Host unknown
<i>P. irritans</i> from Spain LT797452- LT797463	99.5-100%*				
<i>P. irritans</i> from Argentina LT797464	95.9-96.3	100%*			
<i>P. irritans</i> from United States GQ387496. Host unknown	94-95.4	94.4	-		
<i>P. irritans</i> from Cameroon EU169198. Human host	99.5-99.8	96.2	95.1	-	
<i>P. irritans</i> from Iran KX822017. Host unknown	99.6-99.9	96.5	93.9	99.6	-

Table 4. Intrapopulation (*), intraspecific and interspecific similarity observed among all the partial *cox1* mtDNA gene sequences of *Pulex irritans* from different geographical areas obtained in this work and other Pulicidae species from GenBank database. Values are given in percentages. (PI = *Pulex irritans*).

COX1	PI/Seville (Spain)/LT797468-70 (H4-H6)	PI/Santa Cruz (Argentina)/LT797465-67 (H1-H3)	<i>P. irritans</i> /Spain/Badger/KF479246	<i>P. irritans</i> /Spain/Human/KF479247	<i>P. irritans</i> /New Zealand/KY048351	<i>X. cunicularis</i> /Spain/KF479238	<i>A. erinacei</i> /Spain/LT604116	<i>A. erinacei</i> /Corse (France)/LT703439	<i>C. felis</i> /Argentina/LT853879	<i>C. felis</i> /Spain/LN827896	<i>C. canis</i> /Iran/LN827901	<i>E. gallinacea</i> /Australia/JN008921	<i>E. iberica</i> /Spain/KF479239	<i>S. cuniculi</i> /Spain/KF479237
PI/Seville (Spain)/LT797468-70 (H4-H6)	*99.7-99.8													
PI/Santa Cruz (Argentina)/LT797465-67 (H1-H3)	91.5-92.0	*99.3-99.7												
<i>P. irritans</i> /Spain/Badger/KF479246	96.0-96.2	92.8	-											
<i>P. irritans</i> /Spain/Human/KF479247	99.5-99.8	91.8-92.2	96.4	-										
<i>P. irritans</i> /New Zealand/KY048351	99.8-100	91.5-91.8	96.0	99.7	-									
<i>X. cunicularis</i> /Spain/KF479238	86.2-86.4	85.5-85.9	87.0	86.5	86.2	-								
<i>A. erinacei</i> /Spain/LT604116	85.7-85.9	85.0	85.7	85.9	85.7	87.0	-							
<i>A. erinacei</i> /Corse (France)/LT703439	86.5-86.9	85.4-85.7	86.0	86.9	86.7	87.4	98.2	-						
<i>C. felis</i> /Argentina/LT853879	85.7-86.0	84.9-85.2	85.9	85.9	85.9	88.0	86.7	87.2	-					
<i>C. felis</i> /Spain/LN827896	85.7-86.0	84.9-85.2	85.9	85.9	85.9	88.0	86.7	87.2	100	-				
<i>C. canis</i> /Iran/LN827901	86.4-86.5	85.2	86.4	86.7	86.4	87.4	86.7	87.4	97.7	97.7	-			
<i>E. gallinacea</i> /Australia/JN008921	87.9-88.0	87.5	88.9	88.0	87.9	86.7	86.7	87.4	85.7	85.7	86.0	-		
<i>E. iberica</i> /Spain/KF479239	88.7-88.9	89.2-89.5	89.9	88.9	88.7	88.0	88.0	88.2	86.7	86.7	87.2	93.5	-	
<i>S. cuniculi</i> /Spain/KF479237	85.5-85.7	85.2-85.5	86.5	85.9	85.5	87.0	86.0	86.4	86.2	86.2	86.9	86.7	88.4	-

Table 5. Intrapopulation (*), intraspecific and interspecific similarity observed among all the partial *cytb* mtDNA gene sequences of *Pulex irritans* from different geographical areas obtained in this work and other Pulicidae species from GenBank database. Values are given in percentages. (PI = *Pulex irritans*).

CYTB	PI/Seville (Spain)/ LT797473-74 (H8-H9)	PI/Santa Cruz (Argentina)/ LT797475-76 (H1-H7)	<i>A. erinacei</i> / Spain/ LT604120	<i>A. erinacei</i> / Corse (France)/ LT627350	<i>C. felis</i> /Spain/ LN897470	<i>C. felis</i> / Argentina/ LT853878	<i>C. canis</i> /Iran/ LN897471	<i>X. conformis</i> / KM890723	<i>X. skrjabini</i> / KM890718	<i>X. cheopis</i> / Canary Islands/ LT604122	<i>S. cuniculi</i> / KM890622	<i>S. girardi</i> / KM890686	<i>E. oschanini</i> / KM890719
PI/Seville (Spain)/ LT797473-74 (H8-H9)	*99.7-100												
PI/Santa Cruz (Argentina)/ LT797475-81 (H1-H7)	90.9-92.2	*97.8-99.7											
<i>A. erinacei</i> /Spain/ LT604120	84.9-85.2	82.5-83.6	-										
<i>A. erinacei</i> /Corse (France)/ LT627350	85.5-85.8	82.5-83.6	98.9	-									
<i>C. felis</i> /Spain/ LN897470	82.0-82.3	80.6-81.2	84.7	85.2	-								
<i>C. felis</i> /Argentina/ LT853878	82.0-82.3	80.6-81.2	84.7	85.2	100	-							
<i>C. canis</i> /Iran/ LN897471	82.3	79.8-80.4	85.5	86.0	90.6	90.6	-						
<i>X. conformis</i> / KM890723	80.1-80.4	78.2-78.8	82.0	82.5	83.9	83.9	83.6	-					
<i>X. skrjabini</i> / KM890718	79.8-80.1	77.7-78.2	81.7	82.5	84.4	84.4	82.8	92.5	-				
<i>X. cheopis</i> /Canary Islands/ LT604122	75.8	72.6-73.4	79.8	80.1	82.0	82.0	81.2	79.6	80.9	-			
<i>S. cuniculi</i> / KM890622	81.5	81.7-82.3	82.3	82.8	83.1	83.1	83.9	82.3	81.7	80.1	-		
<i>S. girardi</i> / KM890686	80.6-80.9	78.5-79.8	83.6	84.7	84.9	84.9	84.1	84.9	82.8	80.1	78.5	-	
<i>E. oschanini</i> /KM890719	84.9-85.2	81.7-82.3	84.1	84.7	83.6	83.6	83.9	83.9	83.1	78.5	82.0	79.3	-

Table S1. PCR mix, primers and conditions used for each molecular marker sequenced in this study.

	ITS1	ITS2	<i>Cytb</i>	<i>cox1</i>
PCR Mix				
PCR Buffer (5X)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
dNTPs (10mM)	2 µl	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl	6 µl	4 µl	4 µl
Forward Primer (10 µM)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Reverse Primer (10 µM)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Template DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<i>goTaq</i> DNA polymerase	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Autoclaved distilled water to	100 µl	50 µl	50 µl	50 µl
PCR Primers				
Forward Primer	NC5 (Gasser et al., 1996)	senITS2 (Vobis et al., 2004)	CytbF (Dittmar & Whiting, 2003)	LCO1490 (Folmer et al., 1994)
Reverse Primer	ITS1rev (Marrugal et al., 2013)	ITS2R (Luchetti et al., 2007)	A5F (Dittmar & Whiting, 2003)	HCO2198 (Folmer et al., 1994)
PCR Conditions				
Initial Denaturing	94 °C for 5´	94 °C for 5´	95 °C for 12´	96 °C for 2´
Number of cycles	35	35	30	40
Denaturing	94 °C for 30´´	94 °C for 60´´	95 °C for 30´´	94 °C for 30´´
Annealing	58 °C for 30´´	55 °C for 60´´	40 °C for 30´´	50 °C for 30´´
Primer extension	72 °C for 90´´	72 °C for 60´´	68 °C for 2´	72 °C for 60´´
Final extension	72 °C for 5´	72 °C for 10´	68 °C for 7´	72 °C for 7´

FIGURE 1

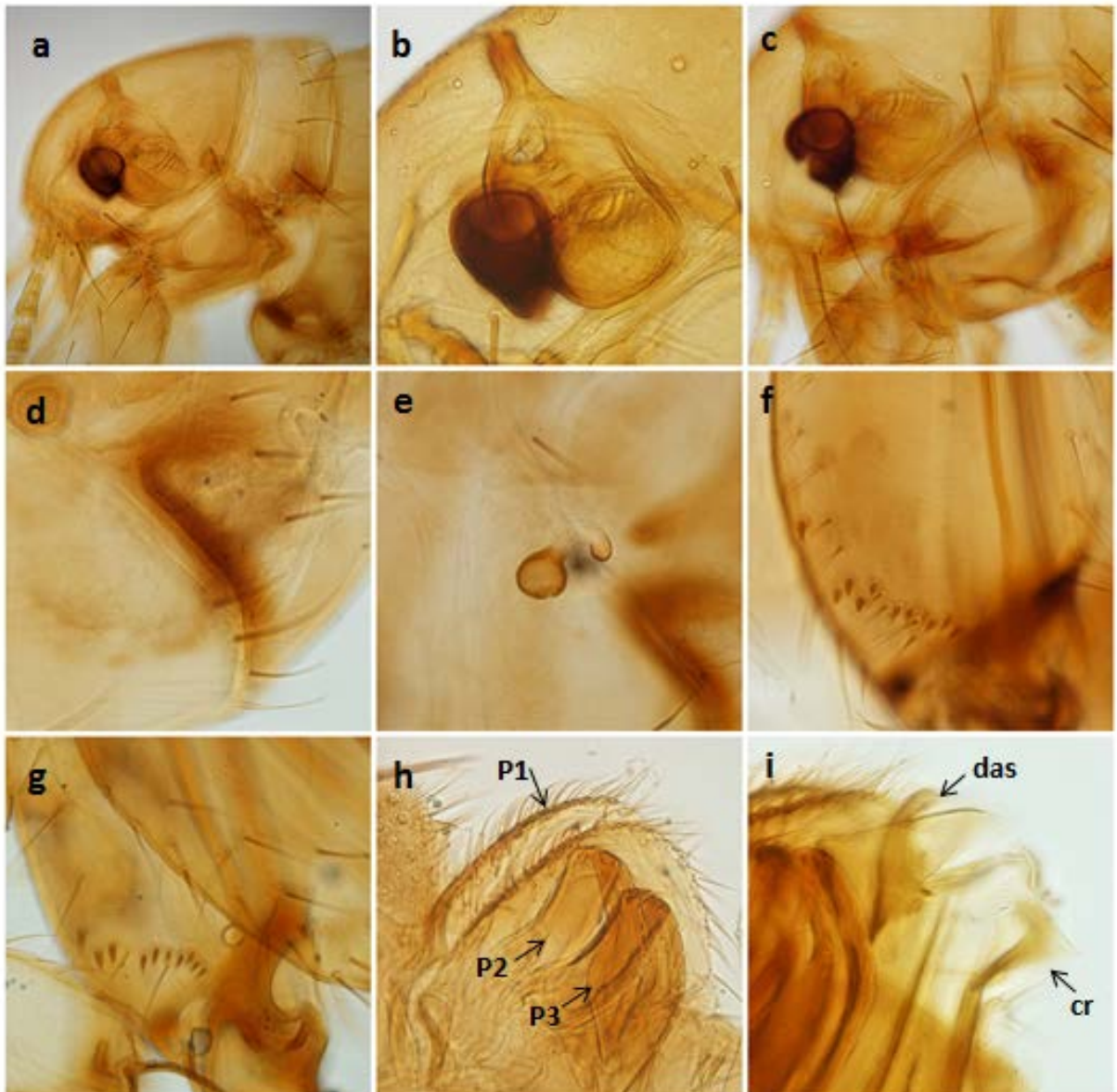


FIGURE 2

```

P. irritans (Argentina 796 bp) ATCGTAACATTACATCGTAAATATGTAATTTAAOCTGCATAGACGTTGTCTT---AC 57
P. irritans (Spain 962 bp) AACGTG----TTACATTTT--GCAATGTAATGAAACGTGTGGGACGTTGTCTGACAC 54
P. irritans (Spain 876 bp) AACGTG----TTACATTTT--GCAATGTAATGAAACGTGTGGGACGTTGTCTGACAC 54
      * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
P. irritans (Argentina 796 bp) GACGACGTCGATAAATCTTCAGGACGGGCGTGGATGGAAGGCTATCTCATCGATAGCC 107
P. irritans (Spain 962 bp) GACGACGTCGATAAATTTTAAGCGTCGGGCGTGGATGGAAGGCTATCTCATCGATAGCC 104
P. irritans (Spain 876 bp) GACGACGTCGATAAATTTTAAGCGTCGGGCGTGGATGGAAGGCTATCTCATCGATAGCC 104
      * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
P. irritans (Argentina 796 bp) GACCGGAGTGGCTCGCTACAACAGAGCTCGACAGGGGCGCTCGCCGTTTTCTTTCGCGT 167
P. irritans (Spain 962 bp) GACCGGAGTGGCTCGCTACAACAGAGCTCGACAGGGGACATCGCCGTTTTCTTTCGCGT 164
P. irritans (Spain 876 bp) GACCGGAGTGGCTCGCTACAACAGAGCTCGACAGGGGACATCGCCGTTTTCTTTCGCGT 164
      * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
P. irritans (Argentina 796 bp) CTCGTAACGACGATCGATCTACGACG--AGAGTGCCCGTGGCTCGACCGGTGTTACCT-- 223
P. irritans (Spain 962 bp) CTCGTAACGACGATCGATCTACGACGATAAAGTGCCCGTGGCTCGACCGGTGTTACCTAC 224
P. irritans (Spain 876 bp) CTCGTAACGACGATCGATCTACGACGATAAAGTGCCCGTGGCTCGACCGGTGTTACCT-- 224
      * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
P. irritans (Argentina 796 bp) ----- 223
P. irritans (Spain 962 bp) GGGTTACCTCGACAGGGCGCATCGCCGTTTTCTTTCGGGTCTCGGACGACGATCGATCT 284
P. irritans (Spain 876 bp) ----- 224

P. irritans (Argentina 796 bp) ----- 223
P. irritans (Spain 962 bp) ACGACGATAAAGTGGCCGTCGCCAACGGGTTAOCCTGACAGGGGCGCATCGCCGTTTTCTT 344
P. irritans (Spain 876 bp) -----ACGGGTTAOCCTGACAGGGGCGCATCGCCGTTTTCTT 260

P. irritans (Argentina 796 bp) ----- 223
P. irritans (Spain 962 bp) TCGCGTCTCGGACGACGATCGATCTACGACGATATAGTGCCCGTGGCTCGACCGGTGTTA 404
P. irritans (Spain 876 bp) TCGCGTCTCGGACGACGATCGATCTACGACGATATAGTGCCCGTGGCTCGACCGGTGTTA 320

P. irritans (Argentina 796 bp) ----ACGGGTT----CACAAATTGGGATGCTGGAGTTCGATGCGACGATTAGGTCTC 274
P. irritans (Spain 962 bp) ACCACGGGTTCAAACACAAATTAGCGATGATTGAGTTCGATGCGACGATTAGGTCTC 464
P. irritans (Spain 876 bp) ACCACGGGTTCAAACACAAATTAGCGATGATTGAGTTCGATGCGACGATTAGGTCTC 380
      * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
P. irritans (Argentina 796 bp) GACCGGGGCGCTCGATACTCTGTGTGTGAGGCATCTGCTATATAAAATAOCTGCTCGTA 334
P. irritans (Spain 962 bp) GACCGGGGCGCTCGATACTCTGTGTGTGAGGCATCTGCTATATAAAATAOCTGCTCGTA 524
P. irritans (Spain 876 bp) GACCGGGGCGCTCGATACTCTGTGTGTGAGGCATCTGCTATATAAAATAOCTGCTCGTA 440
      * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *

```

FIGURE 3

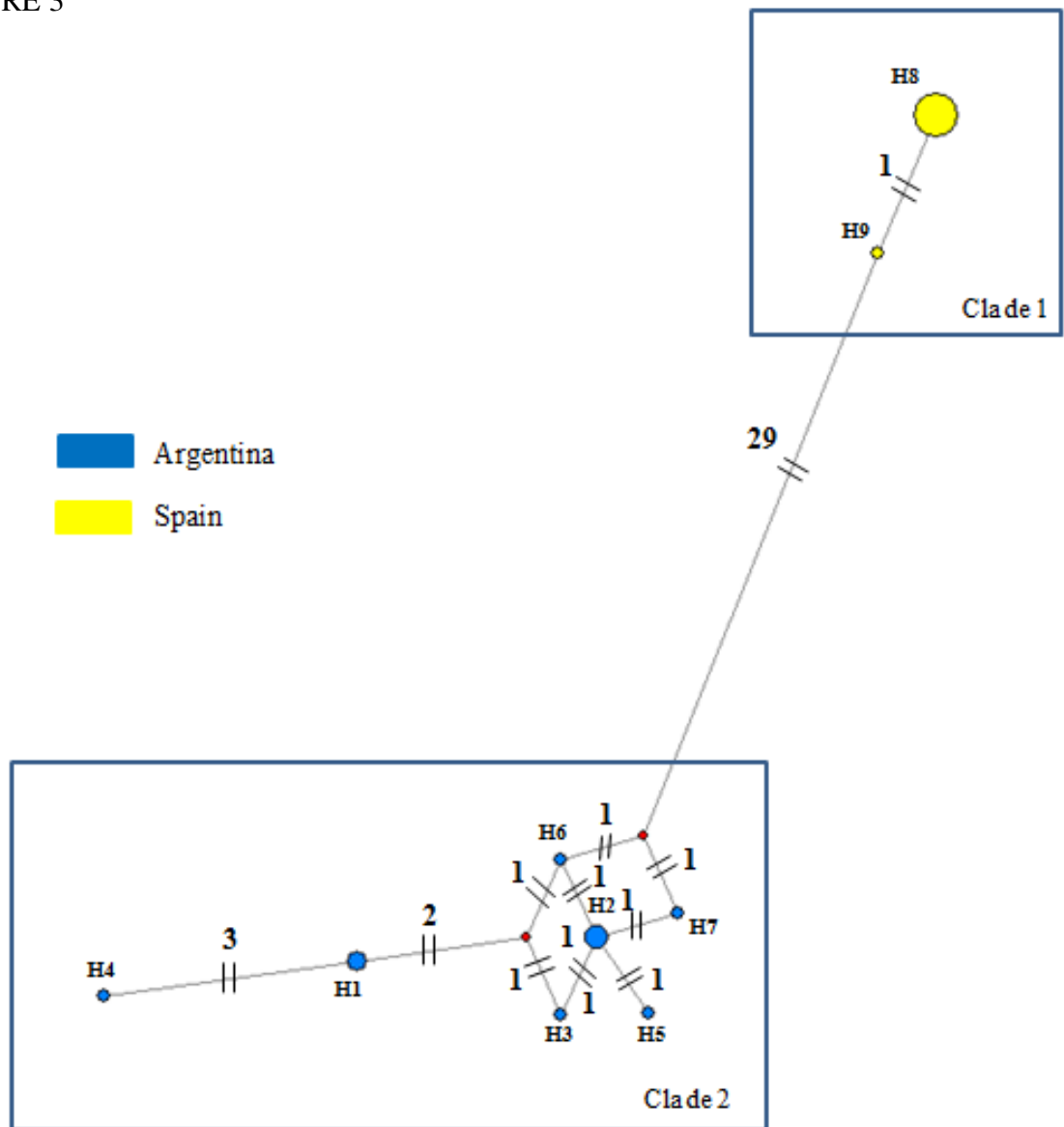


FIGURE 4

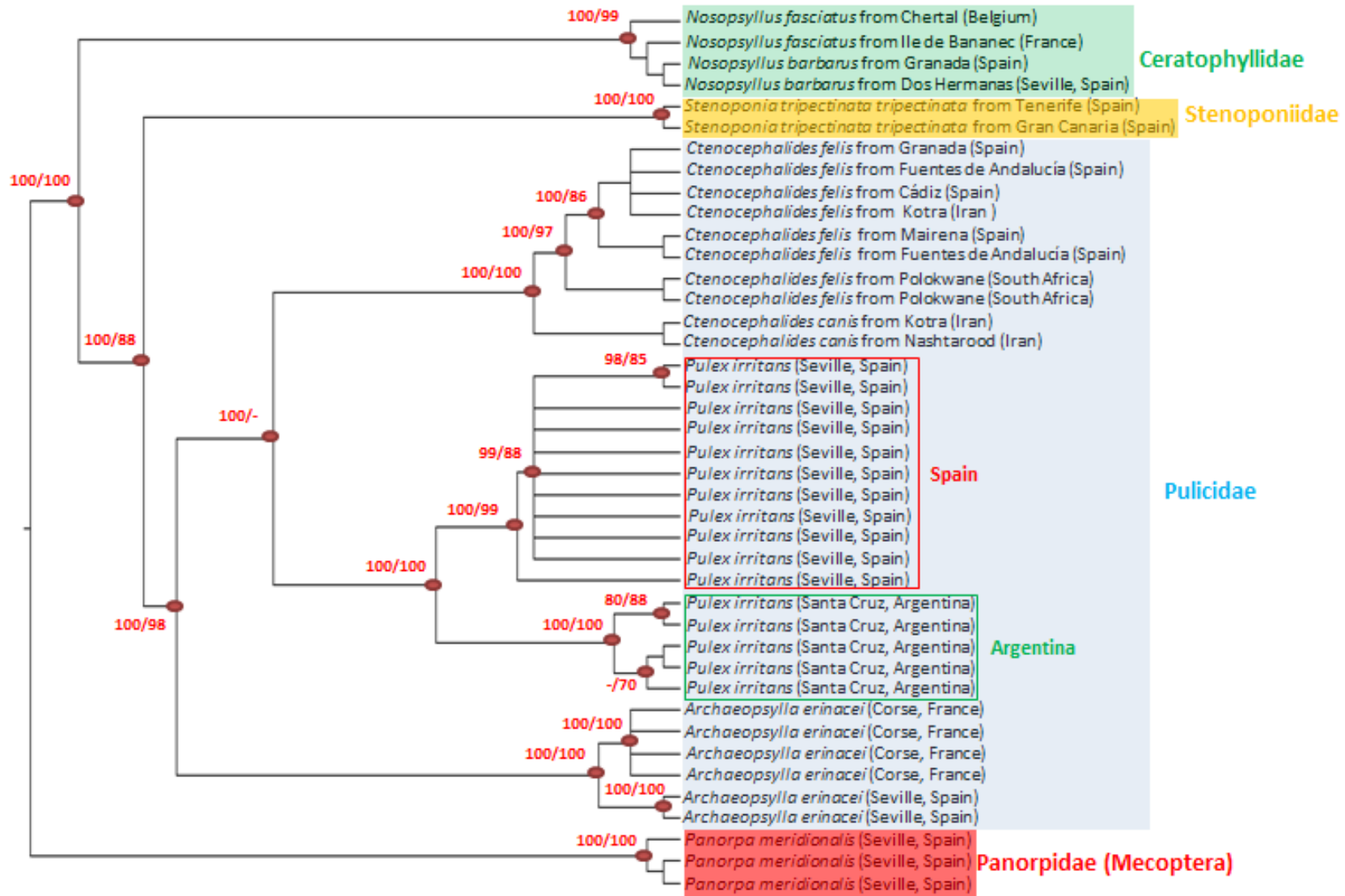


FIGURE S1

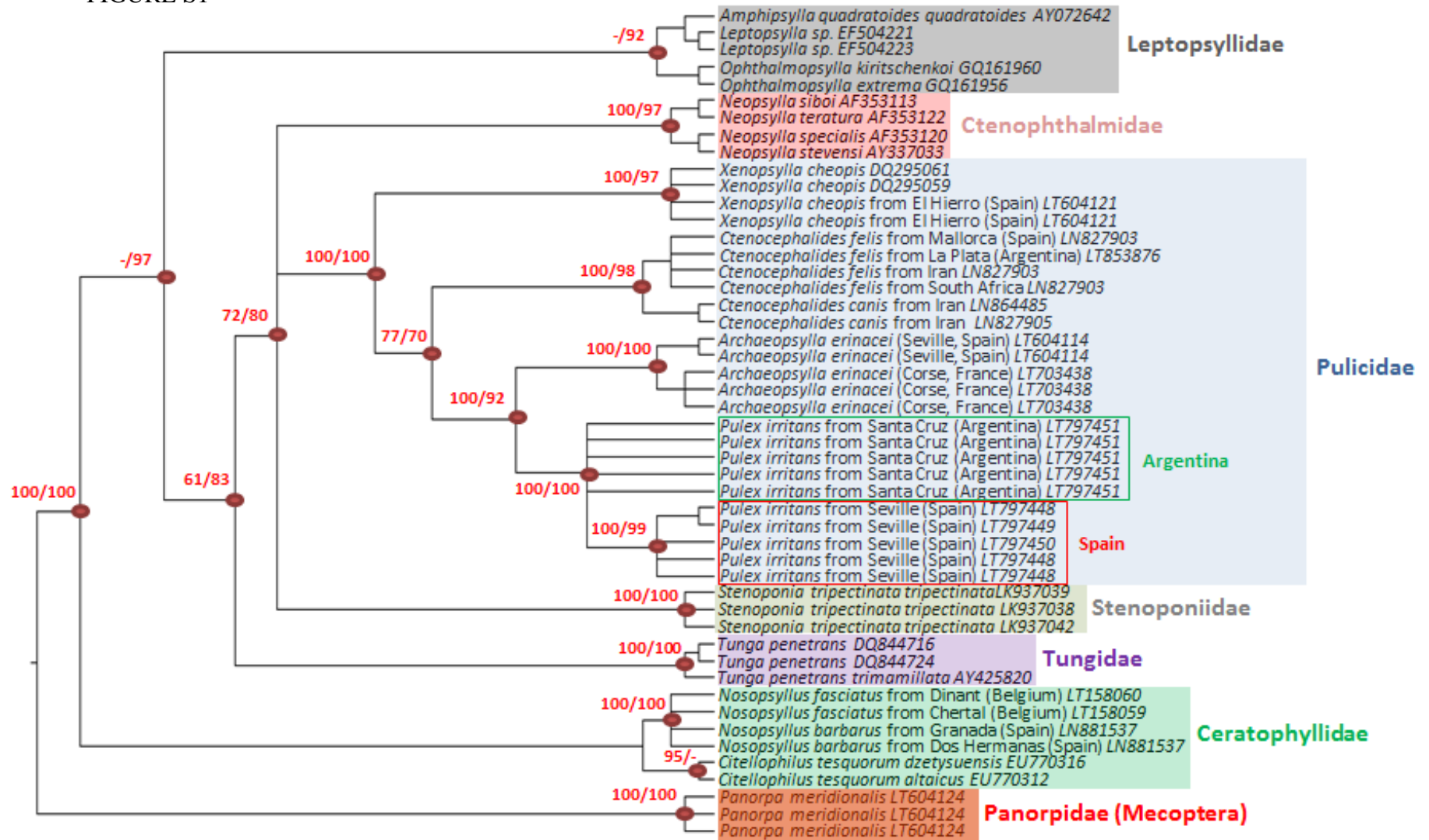
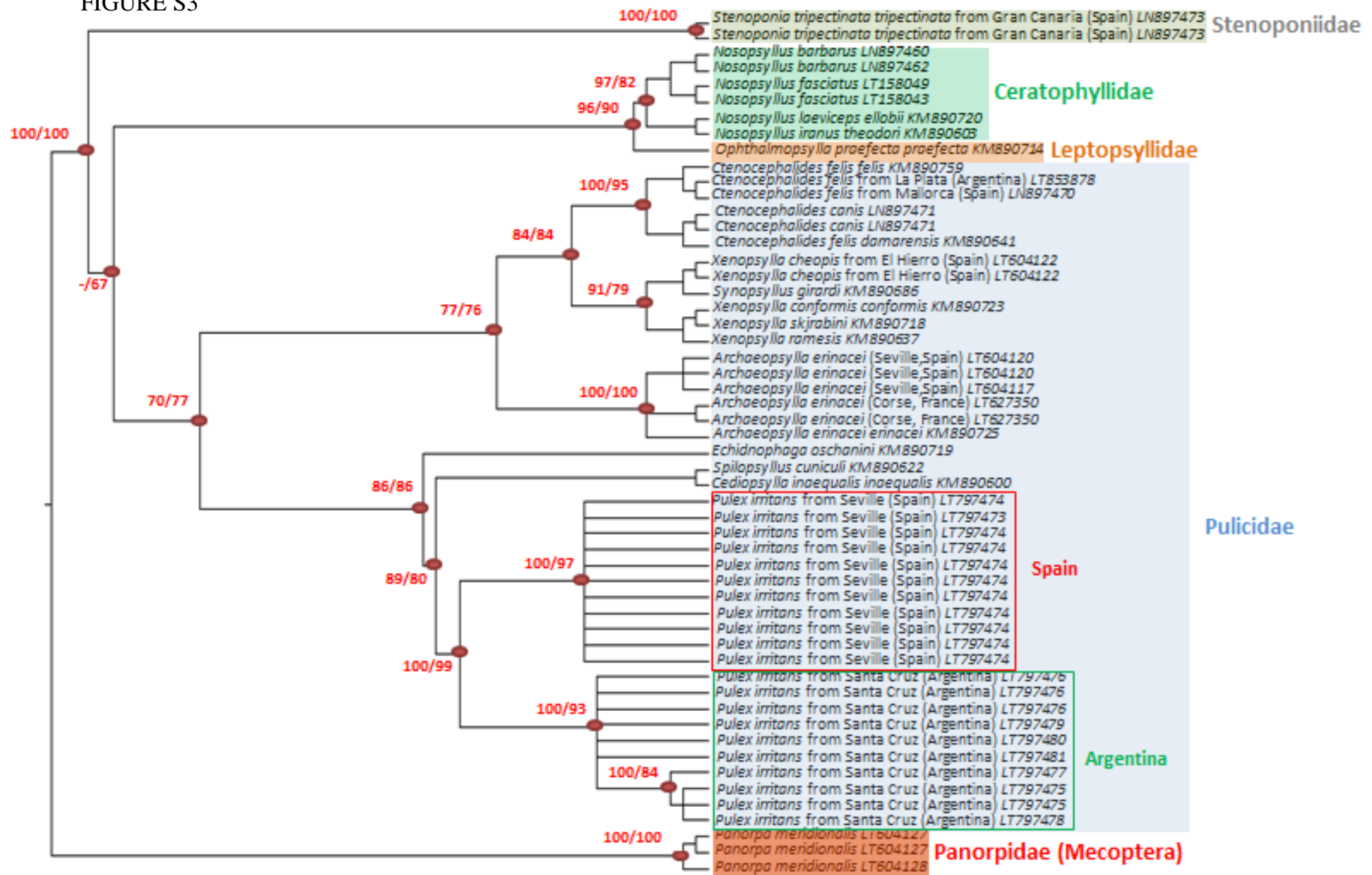


FIGURE S3





CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

La taxonomía actual de los sifonápteros constituye uno de los retos más importantes dentro del campo de la Entomología Médica. La descripción de la mayoría de géneros y especies dentro del Orden Siphonaptera está basada principalmente en una serie de criterios morfológicos; sin embargo, se han realizado pocos estudios basados en datos moleculares. Los caracteres fenotípicos dentro de este grupo están influidos por numerosos factores externos lo que ha provocado la existencia de un gran número de sinonimias y homologías (Whiting y col., 2008). Con anterioridad a este estudio algunos autores como Whiting y col. (2008) o Marrugal y col. (2013) ya habían puesto de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios taxonómicos y filogenéticos basados en datos moleculares dentro de este Orden con el fin de aclarar la compleja situación taxonómica de este grupo.

IV.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS, BIOMÉTRICOS, MOLECULARES Y FILOGENÉTICOS DE DIFERENTES ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA

IV.1.1. *Stenoponia tripectinata* (Zurita y col., 2015)

Las características morfológicas observadas en nuestros ejemplares coincidieron con aquéllas descritas anteriormente por Jordan (1958), Hopkins y Rothschild (1962) y Beaucournu y Launay (1990).

Con respecto al estudio molecular, las secuencias del ITS2 para esta especie fueron bastante más cortas que las correspondientes al ITS1. Este hecho ya había sido observado en otros grupos de insectos como los triatominos (Bargues y col., 2006). A nivel interpoblacional ninguno de los marcadores estudiados (ITS1, ITS2, 18S y *cox1*) mostró un patrón geográfico claro entre las distintas islas estudiadas, con valores de

similitud nucleotídica cercanos siempre al 100 %. La escasa variación nucleotídica observada en el ITS2 pudo ser debida a que las secuencias de ITS2 evolucionan siguiendo la denominada evolución concertada (Smith, 1976) a través de un proceso denominado "Molecular drive" (Dover, 2002). Este proceso engloba mecanismos de sustitución genómica que hacen posible homogeneizar y fijar una región genómica variante dentro de una única unidad reproductiva. Esto conduce a un menor grado de divergencia dentro y entre distintas poblaciones o especies e incluso entre individuos de una misma población. Este resultado coincide con los de algunos estudios realizados en otros grupos de insectos como las moscas del género *Calliphora* (Zaidi y col., 2011) en los que se sugiere la poca utilidad del fragmento ITS2 para diferenciar a nivel molecular distintas poblaciones ó especies congénicas. Sin embargo, este marcador junto con el ITS1 ya había sido utilizado para caracterizar distintas especies dentro del género *Ctenocephalides* (Vobis y col., 2004; Marrugal y col., 2013). La ausencia de secuencias de los espaciadores ITS1 e ITS2 en GenBank u otras bases de datos para especies del género *Stenoponia* nos impidió evaluar la validez de ambos marcadores para llevar a cabo estudios moleculares comparativos y filogenéticos dentro de este género.

Por otro lado, Whiting y col. (2008) basándose en los marcadores moleculares 28S, 18S, *cox2* y EF1- α observó la monofilia de las subfamilias Stenoponiinae y Rhadinopsyllinae situando a ambas como grupos hermanos. En nuestro estudio, el análisis filogenético basado en el gen parcial 18S mostró ambas subfamilias separadas, encontrándose Stenoponiinae más cercana a las familias Ceratophyllidae y Leptopsyllidae. Por su parte, el análisis filogenético basado en el gen parcial *cox1* agrupó tanto a las poblaciones procedentes de las Islas Canarias como de la Península Ibérica en el mismo clado (subfamilia Stenoponiinae); sin embargo, las poblaciones del Archipiélago Canario mostraron un menor grado de polimorfismo genético que aquellas

procedentes de la península. La existencia de un menor nivel de variabilidad genética en poblaciones de islas en comparación con poblaciones continentales fue puesta de manifiesto por Dietzen y col. (2006). La existencia de dos linajes genéticos dentro de *S. t. tripectinata* (Islas Canarias y Península Ibérica) puede estar relacionado con la existencia de barreras geográficas. Además, este marcador (gen *cox1*) situó a la subfamilia Stenoponiinae en politomía con las familias Pygiopsyllidae, Ctenophthalmidae y Pulicidae y sin relacionar con Ceratophyllidae (familia donde históricamente se ha situado el género *Stenoponia*). Estos resultados sugieren un nuevo estatus para la subfamilia Stenoponiinae, que debería ser elevada a nivel de familia incluyendo a todas las especies del género *Stenoponia*.

IV.1.2. *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis* (Zurita y col., 2016a)

El estudio morfológico de las especies *C. canis* y *C. felis* pusieron de manifiesto la existencia de una serie de características morfológicas que no permitían la diferenciación entre ambas especies. Estas características fueron: el número de setas presentes en la parte lateral del metanoto (LMA) y la quetotaxia de la tibia del tercer par de patas. Estas características han sido utilizadas tradicionalmente por numerosos autores como caracteres morfológicos discriminativos entre ambas especies (Holland, 1949; Amin y col., 1974; Amin, 1976); sin embargo, basándonos en estos caracteres encontramos individuos con características morfológicas híbridas entre ambas especies, hecho que ya fue previamente observado por Linardi y Santos (2012). Descartando la posibilidad de la existencia de híbridos por cruzamiento entre ambas especies como citaron Beaucournu y Guiller (2006), no podemos utilizar ambos caracteres morfológicos como válidos a la hora de diferenciar ambas especies. Además, de acuerdo con los datos obtenidos por Marrugal y col. (2013), las diferencias encontradas en los

individuos morfológicamente híbridos no fueron refrendadas con datos moleculares obtenidos a partir de la amplificación de marcadores ribosómicos y mitocondriales.

En el análisis del fragmento ITS1 no se encontraron polimorfismos interpoblacionales ni interespecíficos en *C. felis*. Estos resultados coincidieron con aquéllos obtenidos por Vobis y col. (2004) y Marrugal y col. (2013) donde apenas se encontraron diferencias en las secuencias de este fragmento para distintas poblaciones geográficas de la misma especie. Sin embargo, otros autores como Gamerschlag y col. (2008) sí detectaron diferencias en la longitud de este fragmento entre poblaciones de *T. penetrans* de África y Sudamérica. Por otro lado, la comparación del fragmento ITS1 entre las especies *C. canis* y *C. felis* reveló una gran variabilidad interespecífica coincidiendo con los resultados obtenidos por Marrugal y col. (2013) quienes notificaron la utilidad de este marcador molecular para discriminar a nivel de especies dentro del género *Ctenocephalides*. Respecto al marcador ITS2, como ocurrió con la subespecie *S. t. tripectinata*, la longitud de las secuencias obtenidas en *C. felis* y *C. canis* fueron más cortas que las obtenidas para el ITS1, siendo las secuencias del ITS2 de *C. canis* aportadas por primera vez. El análisis del fragmento ITS2 de especies del género *Ctenocephalides* nos permitió concluir, al igual que en los análisis del ITS1, que el fragmento ITS2 constituye un marcador molecular útil a la hora de discriminar especies dentro del género *Ctenocephalides*. Sin embargo, y como ya se observó para *S. t. tripectinata* (Zurita y col., 2015) y algunas especies de dípteros (Monje y col., 2013), ambos marcadores no consiguieron diferenciar a nivel de poblaciones dentro de una misma especie. A pesar de que algunos autores como Luchetti y col. (2007), basándose en el ITS1, encontraron dos grupos genotípicos (Atlántico y Pacífico) dentro de la especie *T. penetrans*, parece confirmarse la tendencia a la eliminación de mutaciones y polimorfismos entre distintas poblaciones de una misma especie dentro del Orden

Siphonaptera debido a un proceso de evolución concertada para ambos marcadores ``Molecular drive`` (Dover, 2002).

La ausencia de diferencias nucleotídicas en las secuencias del gen parcial 18S de ambas especies confirmó el bajo valor que tiene este marcador molecular para establecer relaciones filogenéticas a este nivel taxonómico. El árbol filogenético basado en este marcador mostró una topología para el género *Ctenocephalides* similar a la obtenida por Whiting y col. (2008). Así, todas las especies pertenecientes al género *Ctenocephalides* aparecieron en politomía en un mismo clado.

Al evaluar las secuencias del gen *cox1* de *C. felis* se observaron cinco haplotipos mientras que no se observó diferencia alguna en las secuencias del mismo marcador para *C. canis* de distintas regiones de Irán. Además, se identificaron una serie de endonucleasas (*SacI*, *SstI*, *TaqI*, *DraI*, *BclI*, *HpaII* y *MspI*) que presentaron un valor diagnóstico para la determinación específica mediante la técnica PCR-RFLP. La divergencia observada entre los distintos haplotipos, incluso entre individuos de una misma población, como es el caso de Fuentes de Andalucía, Sevilla (Haplotipos A, A2 y B) o Mairena, Sevilla (Haplotipos A, A1 y B), ya fue observada por Lawrence y col. (2014) quien encontró diferentes haplotipos para *C. felis* aislados de Australia. En el presente estudio se observó un haplotipo mayoritario para *C. felis* (Haplotipo A) que incluyó secuencias de la República Checa, Irán, India, Tailandia, Islas Fiji y España las cuales se agruparon en el mismo clado junto a los haplotipos A, A1 y A2, mientras que los haplotipos B y C de *C. felis* junto con *C. canis* de Irán conformaron el otro clado principal dentro del género *Ctenocephalides*. Esta topología fue común tanto para el árbol filogenético del gen *cox1* como para el concatenado de las secuencias 18S, ITS1, ITS2 y *cox1*. Esta diversidad de haplotipos observada en el gen *cox1* podría ser explicada por la presencia del endosimbionte *W. pipientis*, detectado con una alta

prevalencia en el presente estudio. Esta bacteria es muy común en artrópodos y en los últimos años ha sido ampliamente estudiada debido a su influencia sobre el ADN mitocondrial de su hospedador.

Algunos autores como Schulenburg y col. (2000), Behura y col. (2001) o Shoemaker y col. (2003), entre otros, han documentado la presencia de dos o más haplotipos en el ADN mitocondrial de algunas especies tales como *Adalia bipunctata* (Coleoptera), *Drosophila Mauritania* (Diptera) o *Solenopsis invicta* (Hymenoptera) como consecuencia de la presencia de *W. pipientis*. Estos autores proponen que si una población resulta infectada por un endosimbionte como *W. pipientis*, éste tiene la capacidad de pasar y expandirse a las siguientes generaciones, de modo que el ADN mitocondrial asociado con la infección inicial se propagará por toda la población permitiendo además la distribución del simbiote por medio de un proceso denominado "selección indirecta del ADN mitocondrial" (Hurst y Jiggins, 2005). Así pues, nuestros resultados sugieren, al igual que anteriores estudios en el Orden Díptera (Monnerot y col., 1990; Rousset y Solignac, 1995), un proceso de introgresión del ADN mitocondrial de *C. canis* sobre *C. felis* inducido por el endosimbionte *W. pipientis*. De acuerdo con Shaw (2002), es posible que la presencia de ciertos endosimbiontes como *W. pipientis* expliquen los casos en los cuales la filogenia basada en marcadores mitocondriales difiera de aquélla basada en marcadores moleculares como ocurre en nuestro caso. Esto es debido a la expansión del endosimbionte que a su vez provocará una expansión del ADN mitocondrial introgresivo asociado a él, provocando una homogeneización de ciertos haplotipos a lo largo de una población (Hurst y Jiggins, 2005).

Por último, atendiendo a los resultados observados en los árboles filogenéticos y redes de mínima expansión podemos sugerir un nuevo estatus para la subespecie *C. felis orientis*, la cual en base a estos datos aparece como una especie bien definida, hecho

que ya observó Lawrence y col. (2015), sugiriendo su elevación a estatus de especie *Ctenocephalides orientis*.

IV.1.3. *Nosopsyllus barbarus* y *Nosopsyllus fasciatus* (Zurita y col., 2018a)

Desde el punto de vista morfológico, las especies *N. barbarus* y *N. fasciatus* han sido históricamente separadas en base a la presencia o ausencia de un lóbulo apical de tamaño variable en el margen posterior del esternito VII de las hembras y en la distribución y posición de las setas del margen ventral del telómero en los machos (Lewis, 1967; Hasstriter y Tipton, 1975; Beaucournu y Launay, 1990; Lewis, 1993). No obstante, han sido varios los autores que han puesto de manifiesto la gran similitud morfológica existente entre ambas especies, especialmente en el caso de los machos, donde las características morfológicas se solapan entre ambas especies (Lewis, 1967; Beaucournu y Launay, 1990; Giannetto y col., 1997). Lewis (1967) y Beaucournu y Launay (1990) apuntaron que ciertas especies monotípicas como *N. fasciatus* podrían estar representadas por diferentes subespecies, al igual que ciertas subespecies admitidas por algunos autores, podrían ser únicamente una variante morfológica de un taxón polimórfico. Este hecho fue corroborado en el presente estudio en el cual, sólo las hembras pudieron ser clasificadas a nivel de especie basándonos en criterios exclusivamente morfológicos. Hasta el momento, la diferenciación entre ambas especies ha consistido en considerar las diferencias morfológicas observadas solo en las hembras o el origen geográfico de los especímenes estudiados, como criterios taxonómicos válidos para discriminar entre *N. barbarus* y *N. fasciatus*. Por todo ello, la presencia o ausencia de un lóbulo apical de tamaño variable en el margen posterior del esternito VII de las hembras podría ser una variable morfológica asociada a un factor geográfico ya que *N. barbarus* ha sido definido como una especie restringida a las islas del Mediterráneo y el Noreste de África, mientras que *N. fasciatus* tiene una distribución

cosmopolita. La reconstrucción filogenética apoyó esta idea ya que los individuos pertenecientes a ambas especies junto con aquellos machos con características morfológicas híbridas aislados de diferentes zonas geográficas, se agruparon juntos en el mismo clado sin seguir ningún tipo de patrón filogenético específico. En la presente Tesis Doctoral, además de citarse por primera vez la presencia de *N. barbarus* en el sur de España (Dos Hermanas, Sevilla), se confirma que *N. barbarus* y *N. fasciatus* comparten los mismos hospedadores, siendo *R. rattus*, *Apodemus sylvaticus* y *Mus spretus* los más comunes, hecho que ya observaron Beaucournu y Launay (1990).

El estudio molecular para estas dos especies confirmó una vez más la menor longitud del fragmento ITS2 en comparación con el ITS1 dentro del Orden Siphonaptera. Debido a que el ADN ribosómico se repite en forma de tándem a lo largo del genoma y presenta numerosos casos de polimorfismo en las secuencias nucleotídicas, se estudió la variabilidad intraindividual para ambos marcadores mediante la secuenciación de un número variable de clones de un mismo individuo. Sin embargo, esta variabilidad nunca superó el 1 %. Por otro lado, no hubo prácticamente diferencias entre las secuencias de los fragmentos ITSs de ambas especies aisladas de diferentes zonas geográficas y hospedadores, a pesar de que los resultados obtenidos para *C. felis* y *C. canis* (Marrugal y col., 2013; Zurita y col., 2016a) y otras especies de sifonápteros (Vobis y col., 2004) habían puesto de manifiesto la utilidad del ITS1 e ITS2 como marcadores de referencia a la hora de caracterizar y discriminar molecularmente a nivel de especie dentro del Orden Siphonaptera. Así por ejemplo, para dos especies congénicas como es el caso de *C. felis* y *C. canis* aisladas de perros de distintas zonas geográficas se obtuvo un porcentaje de similitud interespecífica que osciló entre el 91,9 % (ITS1) y el 96,3 % (ITS2), mientras que para *N. fasciatus* y *N. barbarus* estos valores oscilaron entre un 99,5 % (ITS1) y un 100 % (ITS2). Así pues,

basándonos en los valores de similitud interespecífica obtenidos para ambos marcadores hemos sugerido que ambas especies (*N. fasciatus* y *N. barbarus*) podrían ser sinónimas, ya que las diferencias morfológicas observadas entre los individuos de ambas especies no se correspondían con diferentes secuencias de los ITSs. Este mismo hecho fue observado por Marrugal y col. (2013) en *C. felis*.

La elección de dos marcadores (*cox1* y *cytb*) pertenecientes al genoma mitocondrial para el estudio filogenético se basó en el hecho de que es un genoma mucho más útil que el nuclear para este tipo de análisis debido a la ausencia de intrones, su limitada exposición a la recombinación y su modo de herencia haploide (Saccone y col., 1999). Además, el gen *cox1* presenta algunas ventajas importantes que le hace ser un marcador de referencia para este tipo de estudios, en los cuales se intenta dilucidar el estatus taxonómico de dos especies muy próximas como lo son *N. fasciatus* y *N. barbarus*. Por un lado, los cebadores utilizados para la secuenciación de este gen son uno de los más universales, al ser un gen acotado por zonas muy conservadas que permiten de este modo la secuenciación del gen *cox1* en casi todos los Phyla conocidos (Folmer y col., 1994; Zhang y Hewitt, 1997). Por otro lado, el gen *cox1* parece tener un mayor alcance a la hora de establecer relaciones filogenéticas dentro de un grupo taxonómico que el que poseen otros genes mitocondriales. De hecho, la evolución de este gen es lo suficientemente rápida como para discriminar no solo especies estrechamente relacionadas sino distintas poblaciones dentro de una misma especie (Cox y Hebert, 2001; Wares y Cunningham, 2001). Algunos estudios previos del gen *cox1* en diferentes especies de sifonápteros mostraron un gran nivel de variabilidad intraespecífica (Dittmark y Whiting, 2003; Brinkerhoff y col., 2011). En nuestros resultados también se observó un cierto grado de variabilidad nucleotídica. Sin embargo, los valores de similitud intraespecífica para el gen *cox1* se solaparon con los observados entre las dos

especies. Paralelamente, se observó que los porcentajes de similitud interespecífica observados con otras especies congénicas como *N. laeviceps* y *N. iranus* fueron considerablemente más bajos que los obtenidos entre *N. fasciatus* y *N. barbarus*. Los estudios llevados a cabo en insectos utilizando el gen *cox1* como marcador de referencia muestran un máximo de variación intraespecífica que oscila entre un 3 % y un 3,9 % (Carew y col., 2007). Este alto grado de polimorfismo podría ser explicado por el amplio rango de localidades geográficas utilizadas para el muestreo de cada una de las especies analizadas. Además, en ciertos grupos como los anfibios, se ha observado que cuando un gran número de individuos de una misma especie proceden de localidades geográficas muy distantes, la variación intraespecífica observada puede exceder a la interespecífica incluso cuando se trata de especies congénicas como en nuestro caso. En estos casos se hace difícil establecer un umbral de similitud nucleotídica para la delimitación de especies utilizando sólo el gen *cox1* (Vences y col., 2005). Por ello, para estas situaciones, se han sugerido la utilización de otros marcadores mitocondriales (*cytb*) o nucleares (18S, ITS1 e ITS2). Sin embargo, en la presente Tesis Doctoral, los resultados obtenidos para el gen *cytb* fueron similares a los obtenidos para el gen *cox1*, así pues, para este marcador (*cytb*), los porcentajes de similitud intrapoblacional, interpoblacional e interespecífico quedaron solapados entre ellos. Adicionalmente, el árbol filogenético de las secuencias concatenadas de los marcadores analizados mostró ambas especies agrupadas sin ningún tipo de patrón específico ni geográfico en un mismo clado con altos valores de soporte de rama y separados del resto de especies pertenecientes al género *Nosopsyllus*. Además, la topología del árbol situó a las familias Leptopsyllidae e Ischnopsyllidae como grupos hermanos de la familia Ceratophyllidae. Todos estos resultados sugieren que no existe razón alguna desde un punto de vista morfológico, molecular y filogenético para seguir considerando dos morfoespecies

como *N. fasciatus* y *N. barbarus* como especies diferentes, considerándose ambas como sinónimas. Al mismo tiempo se refuerza la idea defendida por Holland (1964) por la cual las pulgas presentan numerosos casos de evolución paralela de su morfología mediante la modificación y pérdida de estructuras asociadas a la capacidad de parasitar múltiples hospedadores enmascarando de este modo los casos de homologías y sinonimias entre especies.

IV.1.4. *Archaeopsylla erinacei* (Zurita y col., 2018b)

Desde un punto de vista morfológico, Hopkins y Rothschild (1953) fueron los primeros autores que aportaron datos morfológicos con el fin de describir y diferenciar las dos subespecies de *A. erinacei*: *A. e. erinacei* y *A. e. maura*. Estos autores se basaron principalmente en las diferencias encontradas en la longitud total del basímero de los machos de ambas subespecies, mientras que la diferenciación morfológica en las hembras se fundamentó básicamente en la presencia de una o dos setas laterales en el tergito VIII y en la presencia de cuatro o cinco setas laterales a ambos lados del esternito VII. Beaucournu y Launay (1990) aceptaron estos criterios morfológicos diferenciales, excluyendo el número de setas observadas en el esternito VII como carácter diferencial. Sin embargo, estos autores señalaron el alto grado de similitud morfológica observado entre ambas subespecies, añadiendo que solo los machos podían ser clasificados a nivel de subespecie de manera fácil y fiable atendiendo a los criterios morfológicos mencionados. Nuestros resultados morfológicos y biométricos confirmaron la utilidad de la longitud total del basímero como carácter morfológico discriminativo para los machos de *A. e. erinacei* y *A. e. maura*. Así, basándonos en ese criterio los machos aislados de Córcega se clasificaron como *A. e. erinacei*, mientras que aquéllos aislados de Sevilla pertenecieron a la subespecie *A. e. maura*. Sin embargo, y a diferencia de los machos, observamos que los criterios morfológicos utilizados para

discriminar entre las hembras de ambas subespecies carecían de utilidad taxonómica. De este modo, observamos la existencia de tres poblaciones o grupos morfológicos en las hembras aisladas tanto de Córcega como de Sevilla que presentaron características morfológicas que se solapaban unas con otras y que en ninguno de los casos correspondían con aquellos criterios aportados anteriormente por diversos autores. Además tampoco se observó un patrón geográfico de distribución para las poblaciones A y B, que fueron notificadas en ambas zonas geográficas. Con estos resultados se han sugerido dos hipótesis principales: la primera de ellas sería considerar que *A. erinacei* aparece en ambas zonas geográficas (Sevilla y Córcega) y que las poblaciones B y C simplemente constituirían dos variantes pertenecientes a un taxón polimórfico; la segunda de estas hipótesis sería considerar que la clasificación morfológica a nivel de subespecie de las hembras no coincide con la observada en los machos. De modo, que a partir de ahora, deberían considerarse únicamente los criterios definidos en los machos como criterios válidos a la hora de diferenciar entre ambas subespecies hasta que se aporten nuevos criterios para la identificación subespecífica de las hembras. En este sentido, nuestros resultados morfológicos y biométricos mostraron que la longitud total de la espermateca de las hembras podría usarse como criterio taxonómico válido a la hora de discriminar entre ambas subespecies debido a que este criterio sí seguía un patrón geográfico bien definido apoyado además por los resultados moleculares y filogenéticos obtenidos. Así, pudimos observar que los especímenes que presentaban una longitud total de la espermateca mayor a 120 μm correspondían a la subespecie *A. e. maura* (Sevilla), mientras que aquéllos con una longitud total de la espermateca menor de 120 μm correspondían a la subespecie *A. e. erinacei* (Córcega). A pesar de estos resultados preliminares, surge la necesidad de llevar a cabo futuras investigaciones que evalúen por medio de un mayor número de muestras y zonas geográficas analizadas

la utilidad de este carácter morfológico, como criterio taxonómico válido a la hora de discriminar entre ambas subespecies. A la vista de estos resultados es posible que las subespecies *A. e. erinacei* y *A. e. maura* hayan sido identificadas de forma incorrecta en la zona del Mediterráneo. Este hecho podría ser la consecuencia de una identificación basada exclusivamente en los machos o en el origen geográfico de los especímenes estudiados. Como ya apuntaron algunos autores como Lewis (1967) y Beaucournu y Launay (1990) ciertas subespecies de sifonápteros admitidas por algunos autores como tales, podrían ser únicamente una variante morfológica de un taxón polimórfico. Por todo ello, y en vista de los resultados morfológicos observados, surge la necesidad de llevar a cabo estudios moleculares y filogenéticos que complementen la caracterización molecular de *A. erinacei* y sus subespecies, con el fin de dilucidar su estatus taxonómico.

El fragmento ITS2 (ADNr) volvió a ser sustancialmente más corto en longitud que el ITS1 (ADNr) como ya se observó en las especies *S. tripectinata*, *C. felis*, *C. canis*, *N. barbarus* y *N. fasciatus*. Los marcadores nucleares ITS1 e ITS2 no mostraron diferencias nucleotídicas entre los individuos de una misma zona geográfica, independientemente del grupo morfológico al que perteneciesen en el caso de las hembras. Sin embargo, sí se observaron diferentes porcentajes de similitud entre los individuos de Sevilla y Córcega (96,9 % para el ITS2 y 99,1 % para el ITS1). Por lo tanto, ambos marcadores mostraron ser útiles a la hora de diferenciar entre distintos linajes geográficos dentro de una misma especie, hecho, que como ya comentamos en apartados anteriores fue observado por Luchetti y col. (2007) para la especie *T. penetrans*. Adicionalmente, se aportaron un gran número de endonucleasas (*EcoRV*, *HaeIII*, *PhoI*, *AseI*, *VspI*, *AsuII*, *BbuI*, *DraI*, *NlaIII*, *MseI*, *PsiI*, y *SphI*) capaces de discriminar entre ambos linajes geográficos y ambas subespecies por medio de la

técnica PCR-RFLP. Los resultados obtenidos para los marcadores mitocondriales *coxI* y *cytb* coincidieron con los observados para los ITSs, así, se apreciaron dos linajes genéticos claramente diferenciados en función del origen geográfico (Sevilla y Córcega) independientemente del grupo morfológico en las hembras. Este hecho, fue corroborado por los árboles filogenéticos de ambos marcadores y de las secuencias concatenadas, apareciendo dos clados claramente diferenciados correspondientes a Sevilla y Córcega. Además, basándonos en el árbol filogenético del gen *coxI* se observó que los géneros *Ctenocephalides* y *Archaeopsylla* se presentaban estrechamente relacionados dentro de la familia Pulicidae. Este hecho ya fue documentado por Zhu y col. (2015) quienes incluyeron ambos géneros en la subfamilia Archaeopsyllini.

Estudios previos han sugerido que la especificidad de hospedadores de una determinada especie parásita puede influir en su variabilidad genética, así las especies más generalistas que presentan un mayor rango de hospedadores como es el caso de los sifonápteros presentarán un mayor nivel de variabilidad genética intraespecífica que a su vez le permitirá parasitar un mayor rango de especies hospedadoras (Van der Mescht y col., 2015). Como ya se observó en las especies *S. tripectinata*, *C. felis*, *C. canis*, *N. barbarus* y *N. fasciatus*, la variabilidad intraespecífica del gen *coxI* para la especie *A. erinacei* volvió a ser bastante elevada, especialmente en este caso donde las poblaciones estudiadas se refieren a una isla y a una zona continental separadas por una barrera geográfica clara como es el Mar Mediterráneo, esto provoca la existencia de dos linajes geográficos bien definidos. Por otro lado, los valores de similitud entre ambas poblaciones para el gen *coxI* (97,7 %-98,1 %) coincidieron con los observados entre dos especies diferentes como *C. felis* y *C. canis* (97,7 %). Esto podría sugerir que los especímenes de Sevilla y Córcega podrían ser especies distintas, sin embargo en base al análisis K2P y la regla del 10X de Hebert y col. (2003) por la que se establece un

umbral de divergencia nucleotídica por encima del cual dos poblaciones pueden considerarse como especies distintas, no podemos asumir esta teoría. Nuestros resultados coinciden con aquéllos obtenidos por Losos y Ricklefs (2009) quienes defendieron la idea de que los estudios detallados a nivel de poblaciones son útiles para trazar el curso de los procesos evolutivos durante periodos cortos de tiempo. En este sentido, aquellos estudios poblacionales que incluyen poblaciones aisladas en islas o archipiélagos constituyen sistemas ideales para dicho fin, debido a que el trasfondo en el cual se están desarrollando las variaciones intraespecíficas es el mismo que aquél donde se han desarrollado las interespecíficas (Ricklefs y Bermingham, 2001).

IV.1.5. *Pulex irritans*

Entre las especies de pulgas que presentan una distribución prácticamente cosmopolita, las más importantes desde un punto de vista médico y veterinario pertenecen mayoritariamente a las familias Pulicidae (*P. irritans*, *X. cheopis*, *C. felis*, *C. canis*), Ceratophyllidae (*Nosopsyllus consimilis*, *N. fasciatus*) y Leptopsyllidae (*Leptopsylla segnis*) (Krasnov, 2008). La distribución cosmopolita de estas especies suele estar relacionada con su dispersión a través de actividades humanas, animales domésticos o relacionados con la ganadería y algunas especies de roedores comensales (estrechamente relacionados con el hombre). En el caso de *P. irritans*, algunos estudios sitúan su origen en el continente sudamericano (Traub, 1980; Buckland y Sadler, 1989; Beaucournu y col., 1993) y su posterior distribución al viejo mundo en la época de los vikingos (Rothschild, 1973; Buckland y Sadler, 1989) o a través de una antigua cultura distribuida entre Japón y Ecuador (Traub, 1980). Sin embargo, cuando se trata de especies cosmopolitas, en la mayoría de los casos es difícil establecer un origen geográfico, a partir del cual se originó su expansión, debido a que estas especies suelen

distribuirse en numerosas áreas donde comparten hospedadores y condiciones ambientales diferentes (Beaucournu y Pascal, 1998).

En este estudio, los datos morfológicos y biométricos analizados para la especie *P. irritans* procedente de España y Argentina no revelaron diferencias significativas entre ambas poblaciones. Estos resultados difieren de los obtenidos para la especie *A. erinacei*. Además, estos resultados no concuerdan con los datos moleculares obtenidos, ya que éstos revelaron claras diferencias en las secuencias nucleotídicas de ambas poblaciones en base a los marcadores ITS1, ITS2, *cox1* y *cytb*. Como ya hemos visto en la presente Tesis Doctoral, los fragmentos ITSs para otras especies de sifonápteros (*C. felis*, *C. canis*, *A. erinacei*) e incluso en otras especies de artrópodos (Marcilla y col., 2002; de Rojas y col., 2007; Monje y col., 2013; Zagoskin y col., 2014), son de gran utilidad para la caracterización molecular a nivel de especie. Sin embargo, el valor de los espaciadores internos transcritos para estudios filogenéticos a nivel de especies o poblaciones puede variar según la especie objeto de estudio (Von der Schulenburg y col., 2001; Platas y col., 2001). Así por ejemplo, el fragmento ITS2 de algunos géneros como *Drosophila* (Diptera) es más conservado que el ITS1, mientras que en otros como *Gonatocercus* (Hymenoptera) no se observa gran variabilidad nucleotídica en el ITS1 pero sí en el ITS2 (Schlötterer y col., 1994; de Leon y col., 2004). Dentro de las especies estudiadas en la presente Tesis Doctoral nos encontramos con la misma dualidad entre ambos marcadores. Así, para los géneros *Ctenocephalides* y *Archaeopsylla*, el ITS2 mostró un mayor grado de variabilidad nucleotídica interespecífica que el ITS1, mientras que para el género *Nosopsyllus* fue al contrario (Zurita y col., 2016a, 2018a, 2018b). La evolución de los fragmentos ITS parece estar ligada a la existencia de repeticiones internas que originan, especialmente en el ITS1, variaciones en la longitud total de las secuencias aumentando de este modo la

variabilidad nucleotídica observada. La presencia de regiones repetitivas en los fragmentos ITS ha sido documentada ampliamente en numerosos organismos como trematodos, dípteros o coleópteros (Tang y col., 1996; van Herwerden y col., 1998; Gouliamova y col., 1998; Harris y Crandall, 2000; Von der Schulenburg y col., 2001; Warberg y col., 2005).

Los resultados que se han obtenido tras el análisis de las secuencias de ITSs para la especie *P. irritans* no sólo muestran una menor longitud del fragmento ITS2 con respecto al ITS1, sino también una alta variabilidad en la longitud de los fragmentos ITS1. Estas diferencias estuvieron provocadas por la existencia de un fragmento repetitivo de 86 pares de bases que apareció tres y dos veces repetido en las secuencias del ITS1 de los individuos aislados de España. Este hecho no es inusual, y ha sido frecuentemente descrito en otros organismos. Dependiendo de su longitud a veces son llamados mini o microsátélites (den Bakker y col., 2004). Este hecho fue notificado en la especie *T. penetrans* por Gamerschlag y col. (2008) quienes observaron la existencia de diferencias en la longitud de las secuencias del ITS1 entre poblaciones de África y Sudamérica provocadas por la repetición de un fragmento de 99 pares de bases. Este hecho fue atribuido a que el proceso evolutivo del fragmento ITS1 está determinado por la presencia/ausencia de repeticiones internas que dan lugar a variaciones en la longitud total de este marcador molecular aumentando de este modo el factor de variabilidad nucleotídica observado. Además, estos autores observaron también la existencia de fragmentos repetitivos en el ITS1 de otras especies como *C. felis*, *E. gallinacea*, *P. irritans*, *S. cuniculi* y *X. cheopis* remarcando su importancia para la realización de estudios filogeográficos entre diferentes poblaciones, especialmente cuando las diferencias morfológicas observadas entre ellas son mínimas. Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias del ITS1 para *P. irritans* difieren de los obtenidos para

otras especies como *S. tripectinata* o *C. felis* donde el porcentaje de similitud entre poblaciones geográficas fue siempre cercano al 100 %, mientras que el porcentaje de similitud entre las poblaciones de *P. irritans* de España y Argentina osciló entre el 95,9 % y el 96,3 %. Por otra parte, y basándonos en el mismo marcador, cuando se compararon nuestras secuencias de *P. irritans* con aquellas obtenidas de GenBank para la misma especie pero procedentes de diferentes regiones geográficas (Anexo I, tabla 7), se observó un mayor porcentaje de similitud entre las secuencias de los especímenes procedentes de las regiones Paleártica y Afrotropical, observándose los mayores valores de divergencia nucleotídica entre los especímenes de las regiones Neártica y Neotropical. Estos resultados podrían reforzar la idea de Buckland y Sadler (1989), quienes defendían el origen sudamericano de la especie *P. irritans* a diferencia de la mayoría de ectoparásitos capaces de parasitar a los humanos. A su vez, esta especie habría alcanzado la región Paleártica occidental a través de rutas asiáticas o el puente de Beringia durante la era postglacial. Este hecho, unido a un aislamiento reproductivo, podrían haber originado la existencia de dos especies crípticas dentro de *P. irritans*. Esta posibilidad se vería corroborada por la presencia de dos clados correspondientes a las poblaciones de España y Argentina con altos valores de soporte de rama en el árbol filogenético basado en el marcador ITS2

Para corroborar los resultados obtenidos tras el análisis de los fragmentos ITS1 e ITS2 del ADNr se amplificaron los marcadores mitocondriales *cox1* y *cytb*. Ambos marcadores han sido usados frecuentemente para evaluar la diversidad genética de especies crípticas en diferentes grupos de invertebrados (Brinkerhoff y col., 2011; Scheffers y col., 2012; Dantas-Torres y col., 2013; Callejón y col., 2015), en estudios filogeográficos en sifonápteros (Dittmar y Whiting, 2003) o incluso para la determinación de los hospedadores ancestrales de las primeras especies documentadas

dentro del Orden Siphonaptera (Zhu y col., 2015). El gen *cox1* se ha convertido en el marcador de referencia a la hora de delimitar la existencia de especies crípticas en artrópodos (Hebert y col., 2004). De este modo, la región de 658 pares de bases obtenida para este gen constituye un código de barras fiable para la identificación de una especie o población (Hebert y col., 2004; Ward y col., 2005). Nuestros resultados mostraron un valor de similitud intraespecífica entre las poblaciones de España y Argentina bastante bajo (91,5 %-92 %), menor incluso que el obtenido entre dos especies congénéricas como *C. felis* y *C. canis* (97,7 %) aisladas de diferentes zonas geográficas (Zurita y col., 2016a) o entre las poblaciones de las Islas Canarias y la Península Ibérica dentro de la subespecie *S. t. tripectinata* (98,9 %-99,7 %) (Zurita y col., 2015). Los resultados obtenidos para el gen *cytb* confirmaron este bajo grado de similitud intraespecífica entre ambas poblaciones (90,0 %-92,2 %), siendo estos valores iguales o menores que aquéllos observados entre diferentes especies congénéricas como *C. felis* y *C. canis* (90,6 %) o *X. skrjabini* y *X. conformis* (92,5 %). Estos altos niveles de variabilidad intraespecífica o interpoblacional podrían ser explicados por el hecho que las pulgas generalistas como *P. irritans*, que pueden parasitar un amplio rango de hospedadores, suelen mostrar mayor variabilidad genética en comparación con las especies de pulgas específicas de un solo tipo de hospedador, especialmente para los marcadores mitocondriales. Sin embargo, si comparamos nuestros resultados para el gen *cox1* y *cytb* de *P. irritans* con los de otra especie generalista como *C. felis*, no se observaron valores tan bajos de similitud entre diferentes poblaciones. Los árboles filogenéticos basados en los marcadores individuales *cox1*, *cytb* y el concatenado de ambos marcadores junto con el fragmento ITS2, confirmaron la existencia de dos linajes genéticos claramente diferenciados dentro de la especie *P. irritans*. Además, para la *cox1* se observaron en el mismo clado poblaciones de España y Nueva Zelanda aisladas

de diferentes hospedadores (Anexo I, tabla 7) y separadas de los individuos aislados de Argentina, lo cual descarta la posible divergencia genética existente en esta especie por especificidad de hospedador.

IV.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN DISTINTAS ESPECIES DE SIFONÁPTEROS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES (Zurita y col., 2016b)

Como ya indicamos en el apartado de introducción, la incidencia de las posibles enfermedades zoonóticas transmitidas por pulgas en el mundo es mucho mayor de lo que reflejan los datos epidemiológicos actuales. Como consecuencia de esto, a veces el diagnóstico para estas enfermedades por medio de las autoridades sanitarias se retrasa u otras veces el tratamiento de elección no es el idóneo debido al desconocimiento que se tiene sobre ellas. Dado que en la mayoría de los continentes estas enfermedades ya no causan grandes epidemias, éstas han pasado a un segundo plano desde un punto de vista sanitario por lo que no siempre se utilizan las mejores medidas de control y vigilancia frente a ellas. Sin embargo, es importante que todo el personal sanitario encargado de tratar con estas enfermedades esté bien documentado sobre las posibles vías de infección, vectores, hospedadores implicados, así como de la sintomatología de todas estas zoonosis con el fin de actuar de manera rápida, coordinada y eficaz cuando sea necesario (Bitam y col., 2010).

Nuestros resultados confirmaron el papel del género *Wolbachia* y la especie *W. pipientis* como endosimbionte común de las especies *C. felis* y *P. irritans*. Esos resultados coinciden con numerosos estudios que han puesto de manifiesto la presencia de esta bacteria en varias especies del Orden Siphonaptera incluyendo estas dos especies *C. felis* y *P. irritans* (Heukelbach y col., 2004; Oteo y col., 2014). Además, nuestros

resultados también refuerzan la idea aportada por Lo y col. (2007) de que *W. pipientis* es la única especie del género presente en los artrópodos. La prevalencia de dicho simbionte en *C. felis* y *P. irritans* procedente de diferentes áreas geográficas (60,4 %-95,7 %, respectivamente) es similar a la observada por Hilgenboecker y col. (2008) quienes estimaron que este endosimbionte se encontraba en un porcentaje mayor al 65 % en las especies de artrópodos que estudiaron. Sin embargo, otros estudios como los llevados a cabo por Gorham y col. (2003) y Heukelbach y col. (2004) encontraron una prevalencia de *Wolbachia* sp. en diferentes poblaciones de pulgas que osciló entre el 7 % y el 100 % dependiendo de la especie estudiada. Esta gran variedad en los porcentajes obtenidos podría ser consecuencia de los tipos de muestreo utilizados en los que a veces el número de individuos y hospedadores es limitado, así como las zonas geográficas objeto de estudio. Todo ello hace indicar que la especie hospedadora es un factor determinante a la hora de estudiar la prevalencia de *Wolbachia* sp. en pulgas (Gorham y col., 2003). El sexo de los especímenes estudiados también es un factor a tener en cuenta. En nuestros estudios el número de hembras siempre fue mayor que el de machos. Este hecho es común en parásitos temporales como las pulgas, donde los machos a menudo tienen un periodo de vida más corto y más activo, lo que se traduce en una menor dependencia de los hospedadores (Marshall, 1981). Este hecho también podría ser la razón de la alta prevalencia observada de *W. pipientis*. Mediante un proceso denominado "feminización", algunas cepas del género *Wolbachia* son capaces de transformar individuos machos desde un punto de vista genético en hembras funcionales a través de procesos de partenogénesis. Por este mecanismo, las hembras infectadas dan lugar a una descendencia en la cual más del 90 % son hembras, lo que provocará que la frecuencia relativa de hembras infectadas vaya aumentando en cada generación (Cordaux y col., 2011). Este hecho ha sido confirmado en la presente Tesis

Doctoral ya que se observó en todas las áreas estudiadas un porcentaje de especímenes positivos para *Wolbachia* sp. superior al 50 %, excepto en Nashtarood (Irán) y Dílar (España) donde el número de machos analizados fue mayor que el de hembras. Otros autores como Luchetti y col. (2004) también documentaron una mayor prevalencia de este endosimbionte en hembras que en machos de *T. trimamillata*. Por otro lado, en el caso de *C. felis*, los porcentajes de prevalencia en función de la raza de los perros y su estilo de vida (con dueños o de perreras) fueron similares, con lo cual ambos factores parecieron no tener una gran incidencia sobre la prevalencia de *W. pipientis*. Por otro lado, la ausencia de ciertos patógenos como *Bartonella* sp. en *C. felis* podría ser explicada por la presencia de *Wolbachia* sp. La presencia de esta bacteria patógena en *C. felis* ha sido ampliamente documentada en España con diferentes porcentajes de prevalencia (Blanco y col., 2006; Márquez y col., 2009; Gracia y col., 2015); sin embargo, algunos autores como Segoli y col. (2014) y Slatko y col. (2014) han apuntado a *Wolbachia* sp. como diana a la hora de luchar contra la transmisión de ciertos patógenos por artrópodos vectores. Según estos autores este hecho se justificaría por un efecto antagonista entre el endosimbionte y la bacteria patógena lo cual podría explicar una disminución de los casos de co-infección entre *Wolbachia* sp. y *Bartonella* sp. en la especie *C. felis*. Aun así, para confirmar esta hipótesis sería necesario tener un mayor conocimiento epidemiológico sobre el papel y la prevalencia de este endosimbionte en el Orden Siphonaptera así como en los hospedadores parasitados por este grupo de insectos (Dittmar y Whiting, 2004).

La bacteria *R. felis*, agente causal de la fiebre eruptiva en humanos, está considerada como una bacteria patógena emergente cuyo reservorio principal es la pulga del gato *C. felis* (La y col., 2002; Parola, 2011). Esta bacteria parece ser la causante de la fiebre de origen desconocido (FUO) en el África subsahariana y ha sido

recientemente detectada en numerosas especies de mosquitos en esta región (Keita y col., 2013; Mediannikov y col., 2013). En la presente Tesis Doctoral esta bacteria patógena fue detectada únicamente en *C. felis* aislada del sur de España con una prevalencia del 28,3 % reforzando así la idea de Brown y Macaluso (2016) quienes situaban a *C. felis* como el vector y reservorio principal de *R. felis* y cuya distribución cosmopolita estaba asociada a la distribución y expansión de esta especie de pulga. Además, se demuestra que este patógeno está bien establecido en Andalucía (sur de España) como ya pusieron de manifiesto diversos trabajos publicados en los últimos años basados en la detección de este patógeno en humanos, gatos y pulgas mediante técnicas serológicas y moleculares. La prevalencia observada en estos estudios osciló entre un 6,5 % (Bernabeu-Wittel y col., 2006) y un 36,8 % (Gracia y col., 2015).

Los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral constituyen el primer intento de evaluar la presencia de *Mycobacterium* sp. en pulgas. Sin embargo, esta bacteria patógena sí ha sido recientemente detectada mediante qPCR en escorpiones de agua (*Nepomorpha*) (Marion y col., 2011; Konan y col., 2015) y mosquitos (Lavender y col., 2011). En el presente trabajo, *Mycobacterium* sp. fue detectado en *P. irritans* y *C. felis* aislados de Sevilla con una prevalencia del 4,3 % y el 2,0 %, respectivamente mediante la técnica qPCR; sin embargo, cuando intentamos amplificar y secuenciar una región genómica de este patógeno mediante PCR estándar con el fin de realizar una detección específica no pudimos obtener resultados positivos. Esto podría ser debido a una mayor sensibilidad por parte de la técnica de qPCR en comparación con la PCR estándar (Kidd y col., 2008). Aunque no fuésemos capaces de determinar qué especie del género *Mycobacterium* habíamos detectado, los resultados obtenidos deben alertarnos sobre la necesidad de realizar estudios epidemiológicos complementarios, así como de establecer modelos experimentales que nos permitan aclarar cuál es la relación

real entre este género bacteriano y los sifonápteros, así como esclarecer si estos últimos podrían tener un papel importante como vectores en la transmisión de *Mycobacterium* sp.

Una importante lista de especies hospedadoras han sido descritas como portadoras del patógeno *Bartonella* sp., incluyendo un gran número de mamíferos, siendo la mayoría de ellos roedores en contacto directo con los humanos y sus mascotas (Breitschwerdt y col., 2010). Un hospedador puede infectarse por esta bacteria patógena mediante trasplantes de órganos, transfusiones sanguíneas, saliva de artrópodos (pulgas, garrapatas, piojos, flebotomos), mediante heces de pulgas o el arañazo de un gato (enfermedad por arañazo del gato) (Chomel y col., 2009; Regier y col., 2016). En la presente Tesis Doctoral se detectaron tres especies distintas correspondientes al género *Bartonella* en las especies *P. irritans*, *S. tripectinata* y *N. fasciatus* aisladas de diferentes zonas geográficas. Este patógeno mostró una prevalencia del 8,7 % en *P. irritans* de Sevilla. Si bien no fue posible la identificación específica en el caso de las muestras positivas, nuestros resultados refuerzan la idea de que esta especie podría tener un papel importante como vector de *Bartonella* sp. en el sur de España, como ya ha sido documentado por otros autores como Márquez y col. (2009) quienes observaron una prevalencia del 31,8 % en *P. irritans* aislados de las provincias de Huelva y Jaén (España).

Por otro lado, la especie *B. elizabethae* fue detectada en *S. t. tripectinata* aislada de *M. musculus* de las islas de El Hierro, La Palma y Tenerife (Islas Canarias) con una prevalencia media del 43,8 %. Esta prevalencia es mayor que la observada por De Sousa y col. (2006) (37 %) para el mismo patógeno y la misma especie de pulga aisladas de *Mus spretus* de Portugal. Nuestras secuencias fueron 100 % idénticas a aquellas aportadas por estos autores y Márquez y col. (2009) en España, presentando todas ellas

una homología del 99,6 % al 99,8 % con *B. elizabethae* de Georgia (Estados Unidos) (nº acceso en GenBank: JF766264). Además, Gil y col. (2010) documentaron la existencia de dos genotipos estrechamente relacionados con *B. elizabethae* correspondientes a las secuencias aportadas por De Sousa y col. (2006) y Márquez y col. (2009) (homólogos al 100 % con las secuencias que se obtuvieron en este estudio procedente de las Islas Canarias). Esto indicaría que ambos genotipos están bien distribuidos tanto en la Península Ibérica como en las Islas Canarias. Por otro lado, Klangthong y col. (2015) defendía que la distribución de las distintas especies del género *Bartonella* estaría relacionada con un patrón específico de hospedador, lo que podría explicar la identidad del 100 % observada entre las secuencias de las Islas Canarias, Portugal y Andalucía, en el sentido que todas ellas proceden de pulgas aisladas de roedores pertenecientes al género *Mus*.

Hasta tres especies diferentes de *Bartonella* (*B. quintana*, *B. henselae* y *B. elizabethae*) fueron detectadas en la especie *S. tripectinata* de la Isla de Córcega, mientras que solo dos (*B. elizabethae* y *B. henselae*) fueron detectadas en *N. fasciatus* también aislados de la misma isla. Estos resultados constituyen la primera evidencia documentada de la existencia de *B. henselae*, *B. elizabethae* y *B. quintana* en artrópodos vectores procedentes de la Isla de Córcega. Por esta razón, los datos epidemiológicos aportados demostrarían la posibilidad de que *S. t. tripectinata* y *N. fasciatus* pudieran tener un papel importante como vectores de estas especies patógenas en esta zona geográfica constituyendo un problema para la salud humana y animal. El carácter zoonótico de estas bartonelosis tanto en las Islas Canarias como en la Isla de Córcega subraya la necesidad de alertar a las autoridades sanitarias y a la comunidad veterinaria sobre un posible riesgo de infección.

IV.3. IDENTIFICACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES PERTENECIENTES AL ORDEN SIPHONAPTERA Y POSIBLES BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A ELLAS MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA MALDI-TOF MS

Para una utilización óptima de la técnica MALDI-TOF-MS para la identificación de artrópodos es necesaria la estandarización de protocolos que incluyan la preparación de las muestras según el método de conservación de las mismas. Todo ello permitirá la creación de bases de datos con espectros de referencia para cada especie que facilite una identificación rápida y fiable de cualquier grupo de artrópodos y que a su vez pueda ser compartida por cualquier laboratorio de entomología (Nebbak y col., 2017). La conservación de muestras en alcohol de 70° y 96° es utilizada frecuentemente en el campo de la entomología de artrópodos, siendo menos restrictiva que otras, especialmente en el campo de la biología molecular (Reis y col., 2011; Bessas y col., 2016). A pesar de esto, algunos estudios previos revelaron la existencia de ciertas limitaciones a la hora de usar la técnica MALDI-TOF MS en muestras conservadas en alcohol durante largos periodos de tiempo (Yssouf y col., 2014; Nebbak y col., 2017). Recientemente, Diarra y col. (2017) propuso un proceso de desalcoholización para garrapatas conservadas en alcohol que permitía eliminar todo el alcohol y obtener resultados fiables mediante MALDI-TOF MS. En la presente Tesis Doctoral, realizando determinadas modificaciones en el protocolo propuesto por Diarra y col. (2017) conseguimos establecer un protocolo específico para el tratamiento de muestras de pulgas conservadas en alcohol durante diferentes períodos de tiempo con el fin de ser posteriormente analizadas mediante MALDI-TOF MS. La aplicación de esta técnica para la identificación específica de sifonápteros es de gran importancia dada la dificultad que presenta en muchos casos la identificación de este grupo de insectos a

nivel de especie. Además, las claves taxonómicas para este Orden, en la mayoría de los casos son antiguas y se basan exclusivamente en unos pocos criterios morfológicos. Otra ventaja del uso de esta técnica es que permite identificar especímenes que están dañados o deteriorados, lo cual, en algunos casos, hace imposible la identificación morfológica de los mismos. Nuestros resultados coinciden con los publicados por Yssouf y col. (2014) en cuanto al uso de las patas junto con el cefalotórax de cada individuo como mejor muestra posible para el análisis mediante MALDI-TOF MS de sifonápteros. Sin embargo, en este estudio se propone un nuevo protocolo de preparación y homogeneización de las muestras conservadas en alcohol de 70° y 96° durante diferentes períodos de tiempo previo al análisis, lo que que permite obtener espectros de alta calidad e intensidad. De este modo, conseguimos identificar correctamente cuatro especies diferentes conservadas en alcohol con una antigüedad desde un año entero (*N. fasciatus*, *P. irritans* y *S. tripectinata*) hasta más de seis (*C. felis*). Este hecho fue corroborado mediante un test ciego, cuyos resultados mostraron que todos los especímenes fueron correctamente identificados y sólo un 3 % de ellos lo hizo con bajos valores de LSV. Por otro lado, los resultados del dendrograma pusieron de manifiesto la utilidad de esta técnica para discriminar a nivel (taxonómico) de especie y familia. Aunque estos resultados confirmaron la utilidad de la técnica MALDI-TOF MS para la identificación de pulgas preservadas en alcohol, es necesaria la creación de una base de datos con los espectros de referencia de cada especie según su método de conservación previo. Esto debe ser así, en cuanto que para una misma especie los espectros obtenidos de especímenes conservados en alcohol difieren de aquéllos obtenidos a partir de muestras frescas sin conservar. En este sentido, actualizamos la base de datos preliminar con la adición de varios espectros de referencia para las especies *C. felis*, *P. irritans*, *N. fasciatus* y *S. tripectinata* conservadas en

alcohol. A pesar de la escasez actual de espectros de referencia en nuestra base de datos, cabe esperar una expansión de la misma ya que la técnica MALDI-TOF MS podría revolucionar el campo de la entomología de artrópodos en los próximos años, convirtiéndose de este modo en una herramienta de referencia como lo es actualmente en la Microbiología.

El análisis de los espectros obtenidos, puso de manifiesto la capacidad de la técnica MALDI-TOF MS para identificar especímenes infectados o no por distintas especies de *Bartonella* mediante la identificación de una serie de picos discriminativos entre los espectros de las muestras infectadas y no infectadas. Sin embargo, durante nuestro estudio no pudimos añadir a la base de datos ningún espectro asociado con la presencia de *Bartonella* sp. debido a que no se obtuvo un número representativo de especies de pulgas positivas para este patógeno con el fin de llevar a cabo un análisis ciego entre especímenes infectados y no infectados que nos permitiese discriminar entre ambos grupos. A pesar de esto, nuestros resultados coinciden con algunos estudios en los que se ha puesto de manifiesto la utilidad de esta técnica para la identificación de garrapatas infectadas o no por ciertos patógenos como *Borrelia* sp. o *R. felis* (Fotso Fotso y col., 2014; Yssouf y col., 2015). En estos trabajos, sí se añadió a la base de datos un espectro de referencia para cada especie según su estatus infeccioso para un patógeno determinado. Por todo esto, la técnica MALDI-TOF MS ha demostrado ser útil para la detección de sifonápteros infectados o no por *Bartonella* sp. sin necesidad de utilizar técnicas moleculares que requieren procedimientos más largos y costosos. Tenemos que tener en cuenta la gran importancia que podría suponer el uso dual de esta técnica proteómica tanto para la identificación específica de las especies como para la identificación de su estatus infeccioso de manera rápida, eficaz y reproducible. De este modo nos permitiría tomar decisiones relacionadas con la monitorización específica de

un paciente o la administración de un tratamiento preventivo contra ciertas enfermedades transmitidas por pulgas u otros artrópodos vectores.

IV.4. BIBLIOGRAFÍA

Amin, O.M., Wells, T.R. y Gatley, H.L. (1974) Comb variations in the cat flea, *Ctenocephalides f. felis* (Bouché). *Annals of the Entomological Society of America*, 67: 831–834.

Amin, O.M. (1976) Host associations and seasonal occurrence of fleas from Southeastern Wisconsin mammals with observations on morphologic variations. *Journal of Medical Entomology*, 13: 179–192.

Bargues, M.D., Klisiowicz, D.R., Panzera, F., Noireau, F., Marcilla, A., Perez, R., Rojas, M.G., O'Connor, J.E., Gonzalez-Candelas, F., Galvão, C., Jurberg, J., Carcavallo, R.U., Dujardin, J.P. y Mas-Coma, S. (2006) Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infection, Genetics and Evolution*, 6: 46–62.

Beaucournu, J.C. y Launay, H. (1990) Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental, Faune de France, Vol. 76. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris.

Beaucournu, J.C., Le Piver, M. y Guiguen, C. (1993) The present status of the conquest of tropical Africa by *Pulex irritans* Linnaeus, 1758. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, 86: 290-294.

Beaucournu, J.C. y Pascal, M. (1998) Origine biogeographique de *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc, 1800) (Siphonaptera-Ceratophyllidae) et observations sur son hote primitif. *Biogeographica*, 74, 132–135.

Beaucournu, J.C. y Guiller, A. (2006) Réponse à l'article "Keine molekularbiologischen Anzeichen für Unterarten beim Katzenfloh *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Ctenocephalidae)" par H. Mehlorn, J. D'Haese, M. Vobis & N. Mencke: *Entomologia Generalis*, 27: 295-301. *Entomologia Generalis*, 28: 311–315.

Behura, S.K., Sahu, S.C., Mohan, M. y Nair, S. (2001) *Wolbachia* in the Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason): correlation between host mitotypes and infection status. *Insect Molecular Biology*, 10: 163–171.

Bernabeu-Wittel, M., del Toro, M.D., Noguerras, M.M., Muniain, M.A., Cardeñosa, N. y Márquez, F.J (2006) Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and

Rickettsia conorii infection among the population of southern Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25: 375–381.

Bessas, A., Leulmi, H., Bitam, I., Zaidi, S., Ait-Oudhia, K., Raoult, D. y Parola, P. (2016) Molecular evidence of vector-borne pathogens in dogs and cats and their ectoparasites in Algiers, Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 45: 23–28.

Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M.F. y Raoult, D. (2010) Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 14: 667–676.

Blanco, J.R. y Raoult, D. (2005) Diseases produced by Bartonella. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23: 313–319.

Breitschwerdt, E.B., Maggi, R.G., Chomel, B.B. y Lappin, M.R. (2010) Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* (San Antonio), 20: 8–30.

Brinkerhoff, R.J., Martin, A.P., Jones, R.T. y Collinge, S.K. (2011) Population genetic structure of the prairie dog flea and plague vector, *Oropsylla hirsuta*. *Parasitology*, 138: 71–79.

Brown, L.D. y Macaluso, K.R. (2016) *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. *Current Tropical Medicine Reports*, 3: 27–39.

Buckland, P.C. y Sadler, J.P. (1989) A biogeography of the human flea, *Pulex irritans* L. (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Biogeography*, 16: 115–120.

Callejón, R., Gutiérrez-Avilés, L., Halajian, A., Zurita, A., de Rojas, M. y Cutillas, C. (2015) Taxonomy and phylogeny of *Trichuris globulosa* Von Linstow, 1901 from camels. A review of *Trichuris* species parasitizing herbivorous. *Infection, Genetics and Evolution*, 34: 61–74.

Carew, M.E., Pettigrove, V., Cox, R.L. y Hoffmann, A.A. (2007) DNA identification of urban *Tanytarsini chironomids* (Diptera: Chironomidae). *Journal of the North American Benthological Society*, 26: 587–600.

Chomel, B.B., Kasten, R.W., Williams, C., Wey, A.C., Henn, J.B., Maggi, R., Carrasco, S., Mazet, J., Boulouis, H.J., Maillard, R. y Breitschwerdt, E.B. (2009) *Bartonella*

endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and patients. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1166: 120–126.

Cordaux, R., Bouchon, D. y Grève, P. (2011) The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics*, 27: 332–341.

Cox, A.J. y Hebert, P.D.N. (2001) Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10: 371–386.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A. y Otranto, D. (2013) Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites and Vectors*, 6: 213.

De Sousa, R., Edouard-Fournier, P., Santos-Silva, M., Amaro, F., Bacellar, F. y Raoult, D. (2006) Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 727–731.

de Leon, J.H., Jones, W.A. y Morgan, D.J. (2004) Molecular distinction between populations of *Gonatocerus morrilli*, egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter from Texas and California: do cryptic species exist. *Journal of Insect Science*, 4: 39.

de Rojas, M., Ubeda J.M., Cutillas, C., Mora, M.D., Ariza, C. y Guevara, D. (2007) Utility of ITS1-5.8S-ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the *Rhinonyssus coniventris* species complex (Acari: Rhinonyssidae). *Parasitology Research*, 100: 1041–1046.

den Bakker, H.C., Gravendeel, B. y Kyper, D.W. (2004) An ITS phylogeny of *Leccinum* and an analysis of the evolution of minisatellite-like sequences within ITS1. *Mycologia*, 95: 102–118.

Diarra, A.Z., Almeras, L., Laroche, M., Berenger, J.M., Koné, A.K., Bocoum, Z., Dabo, A., Doumbo, O., Raoult, D. y Parola, P. (2017) Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria in Mali. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11: e0005762.

Dietzen, C., Voigt, C., Wink, M., Gahr, M. y Leitner, S. (2006) Phylogeography of island Canary (*Serinus canaria*) populations. *Journal of Ornithology*, 147: 485–494.

-
- Dittmar, K. y Whiting, M.F. (2003) Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (*CytB* and *CoII*). *Parasitology Research*, 91: 55–59.
- Dittmar, K. y Whiting, M.F. (2004) New *Wolbachia* endosymbionts from nearctic and neotropical fleas (Siphonaptera). *Journal of Parasitology*, 90: 953–957.
- Dover, G.A. (2002) Molecular drive. *Trends in Genetics*, 18: 587–589.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 3: 294–299.
- Fotso Fotso, A., Mediannikov, O., Diatta, G., Almeras, L., Flaudrops, C., Parola P. y Drancourt, M. (2014) MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crocidurae/Ornithodoros sonrai* paradigm. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8: e2984.
- Gamerschlag, S., Mehlhorn, H., Heukelbach, J., Feldmeier, H. y D’Haese, J. (2008) Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). *Parasitology Research*, 102: 193–199.
- Giannetto, S., Virga, A. y Iori, A. (1997) New record of *Nosopsyllus* (*Nosopsyllus*) *barbarus* (Jordan and Rothschild, 1912) (Aphaniptera: Dolichopsyllidae) from Sicily. Morphology at scanning electron microscopy of *N. (N.) barbarus* and *N. (N.) fasciatus* (Bosc D’Antic, 1800). *Parassitologia*, 39: 29–32.
- Gil, H., García-Esteban, C., Barandika, J.F., Peig, J., Toledo, A., Escudero, R., Jado, I., Rodríguez-Vargas, M., García-Amil, C., Lobo, B., Roales, P., Rodríguez-Moreno, I., Olmeda, A.S., García-Pérez, A.L. y Anda, P. (2010) Variability of *Bartonella* genotypes among small mammals in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 8062–8070
- Gorham, C.H., Fang, Q.Q. y Durden, L.A. (2003) *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *Journal of Parasitology*, 89: 283–289.

- Gouliamova, D.E., Hennebert, G.L., Smith, M.T. y van der Walt, J.P. (1998) Diversity and affinities among species and strains of Lipomyces. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74: 283–291.
- Gracia, M.J., Marcén, J.M., Pinal, R., Calvete, C. y Rodes, D. (2015) Prevalence of *Rickettsia* and *Bartonella* species in Spanish cats and their fleas. *Journal Vector Ecology*, 49: 233–239.
- Harris, D.J. y Crandall, K.A. (2000) Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and micro satellite studies. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 284–291.
- Hastriter, M.W. y Tipton, V.J. (1975) Fleas (Siphonaptera) associated with small mammals of Morocco. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*, 50: 79–169.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. y De Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270: 313–321.
- Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. y Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 14812–14817.
- Heukelbach, J., Bonow, I., Witt, L., Feldmeier, H. y Fischer P (2004) High infection rate of *Wolbachia* endobacteria in the sand flea *Tunga penetrans* from Brazil. *Acta Tropica*, 92: 225–230.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. y Werren, J.H. (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281: 215–220.
- Holland, G.P. (1949) The Siphonaptera of Canada. *Canada Department of Agriculture Technical Bulletin*, 70: 1–306.
- Holland, G.P. (1964) Evolution, classification, and host relationships of Siphonaptera. *Annual Review of Entomology*, 9: 123–146.

Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1953) An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History), Tungidae and Pulicidae, Vol. 1. Trustees of the British Museum (Natural History), London.

Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1962) An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History). Vol. 3. Hystrichopsyllidae, Trustees of the British Museum (Natural History), London.

Hurst, G.D.D. y Jiggins, F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 272: 1525–1534.

Jordan, K. (1958) A contribution to the taxonomy of *Stenoponia* J. y R. (1911), a genus of Palaearctic and Nearctic fleas. *British Museum (Natural History)*, 6: 169–202.

Keita, A.K., Socolovschi, C., Ahuka-Mundeke, S., Ratmanov, P., Butel, C. y Ayouba, A. (2013) Molecular evidence for the presence of *Rickettsia felis* in the feces of wild living African apes. *PLoS One*, 8: e54679.

Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P.P., Hegarty, B., Tucker, M. y Breitschwerdt, E. (2008) Evaluation of conventional and realtime PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. *Veterinary Microbiology*, 129: 294–303.

Klangthong, K., Promsthaporn, S., Leepitakrat, S., Schuster, A.L., McCardle, P.W., Kosoy, M. y Takhampunya, R. (2015) The distribution and diversity of *Bartonella* species in rodents and their ectoparasites across Thailand. *PLoS One*, 10: e0140856.

Konan, K.L., Doannio, J.M., Coulibaly, N.G., Ekaza, E., Marion, E., Assé, H., Kouassi, D., N'Goran, K.E., Dosso, M., Marsollier, L. y Aubry, J. (2015) Detection of the IS2404 insertion sequence and ketoreductase produced by *Mycobacterium ulcerans* in the aquatic Heteroptera in the health districts of Dabou and Tiassalé in Côte d'Ivoire. *Medecine et Sante Tropicales*, 25: 44–51.

Krasnov, B.R. (2008) Functional and Evolutionary Ecology of Fleas. Cambridge University Press, New York (United States of America).

La, S.B., Meconi, S., Fenollar, F., Rolain, J.M., Roux, V. y Raoult, D. (2002) Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer y col. 2001), a temperature-dependent cultured

bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 2035–2041.

Lavender, C.J., Fyfe, J.A., Azuolas, J., Brown, K., Evans, R.N., Ray, L.R., Johnson y P.D. (2011) Risk of Buruli ulcer and detection of *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes in southeastern Australia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5: e1305.

Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, M. y Slapeta, J. (2014) High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology*, 28: 330–336.

Lawrence, A.L., Hii, S.F., Jirsová, D. Panáková, L., Ionică, A.M., Gilchrist, K., Modrý, D., Mihalca, A.D., Webb, C.E., Traub, R.J. y Šlapeta, J. (2015) Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Veterinary Parasitology*, 210: 215–223.

Lewis, R.E. (1967) Contributions to a taxonomic revision of the genus *Nosopsyllus* Jordan, 1933. *Journal of Medical Entomology*, 4: 123–142.

Lewis, R.E. (1993) Notes on the geographical distribution and host preferences in the Order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Journal of Medical Entomology*, 30: 239–256.

Linardi, P.M. y Santos, J.L.C. (2012) *Ctenocephalides felis felis* vs *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera:Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 4: 345–354.

Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S.L., Werren, J.H., Bordenstein, S.R. y Bandi, C. (2007) Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 654–657.

Losos, J.B. y Ricklefs, R.E. (2009) Adaptation and diversification on islands. *Nature*, 457: 830–836.

- Luchetti, A., Mantovani, B., Fioravanti, M.L. y Trentini, M. (2004) *Wolbachia* infection in the newly described Ecuadorian sand flea, *Tunga trimamillata*. *Experimental Parasitology*, 108:18–23.
- Luchetti, A., Trentini, M., Pampiglone, S., Fiorawanti, M.L. y Mantovani, B. (2007) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) and fleas across South America and Africa. *Parasitology Research*, 100: 593–598.
- Marcilla, A., Bargues, M.D., Abad-Franch, F., Panzera, F., Carcavallo, R.U., Noireau, F., Galvão, C., Jurberg, J., Miles, M.A., Dujardin, J.P. y Mas-Coma, S. (2002) Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infections, Genetics and Evolution*, 1: 225–235.
- Marion, E., Deshayes, C., Chauty, A., Cassisa, V., Tchibozo, S., Cottin, J., Doannio, J., Marot, A. y Marsollier, L. (2011) Detection of *Mycobacterium ulcerans* DNA in water bugs collected outside the aquatic environment in Benin. *Medecine Tropicale*, 71: 169–172.
- Márquez, F.J., Millán, J., Rodríguez-Liévana, J.J., García-Egea, I. y Muniain, M.A. (2009) Detection and identification of *Bartonella* sp. in fleas from carnivorous mammals in Andalusia, Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 23: 393–398.
- Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. y Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research*, 112: 2289–2298.
- Marshall, A.G. (1981) *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic, New York.
- Mediannikov, O., Socolovschi, C., Edouard, S., Fenollar, F., Mouffok, N. y Bassene, H. (2013) Common epidemiology of *Rickettsia felis* infection and malaria, Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 19: 1775–1783.
- Monnerot, M., Solignac, M. y Wolstenholme, D.R. (1990) Discrepancy in divergence of the mitochondrial and nuclear genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*. *Journal of Molecular Evolution*, 30: 500–508.

Monje, L.D., Quiroga, M., Manzoli, D., Couri, M.S., Silvestri, L., Venzal, J.M., Cuervo, P. y Beldomenico, P.M. (2013) Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from *Philornis seguyi* (García, 1952) and *Philornis torquans* (Nielsen, 1913) (Diptera: Muscidae). *Systematic Parasitology*, 86: 41–53.

Nebbak, A., El Hamzaoui, B., Berenger, J.M., Bitam, I., Raoult, D., Almeras, L. y Parola, P. (2017) Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. *Medical and Veterinary Entomology*, 31: 438–448.

Oteo, J.A., Portillo, A., Portero, F., Zavala-Castro, J., Venzal, J.M., Labruna, M.B. (2014) ‘Candidatus *Rickettsia asemboensis*’ and *Wolbachia* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador. *Parasites and Vectors*, 30: 455.

Parola, P. (2011) *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 996–1000.

Platas, G., Acero, J., Borkowski, J.A., Gonzalez, V., Portal, M.A., Rubio, V., Sanchez-Ballesteros, J., Salazar, O. y Pelaez, F. (2001) Presence of a simple tandem repeat in the ITS1 region of the Xylariales. *Current Microbiology*, 43: 43–50.

Regier, Y., O'Rourke, F. y Kempf, V.A. (2016) Erratum to: *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasites and Vectors*, 9: 330.

Reis, C., Cote, M., Le Rhun, D., Lecuelle, B., Levin, M.L., Vayssier-Taussat, M. y Bonnet, S.I. (2011) Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5: e1186.

Ricklefs, R.E. y Bermingham, E. (2001) Nonequilibrium diversity dynamics of the lesser Antillean avifauna. *Science*, 294: 1522–1524.

Rousset, F. y Solignac, M. (1995) Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 6389–6393.

Rothschild, M. (1973) Report on a femal *Pulex irritans* in a tenth century Viking pit. *Proceedings of the Royal Society of London*, 38: 29.

Saccone, C., DeCarla, G., Gissi, C., Pesole, G. y Reynes, A. (1999) Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238: 195–210.

Scheffers, B.R., Joppa, L.N., Pimm, S.L. y Laurance, W.F. (2012) What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 27: 501–510.

Schlötterer, C., Hauser, M.T., von Haeseler, A. y Tautz, D. (1994) Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 513–522.

Schulenburg, J.H., Hurst, G.D., Huigens, T.M., van Meer, M.M., Jiggins, F.M. y Majerus, M.E. (2000) Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 584–600.

Segoli, M., Hoffman, A., Lloyd, J., Omodei, G. y Ritchie, S. (2014) The effect of virus-blocking *Wolbachia* on male competitiveness of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8:3294.

Shaw, K.L. (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16122–16127.

Shoemaker, D.D., Ahrens, M., Sheill, L., Mescher, M., Keller, L. y Ross, K.G. (2003) Distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology*, 32: 1329–1336.

Slatko, B.E., Luck, A.N., Dobson, S.L. y Foster, J.M. (2014) *Wolbachia* endosymbionts and human disease control. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195: 88–95.

Smith, G.P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, 191: 528–535.

Tang, J., Toe, L., Back, C. y Unnasch, T.R. (1996) Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 244–252.

Traub, R. (1980) The zoogeography and evolution of some fleas, lice and mammals. – In: Traub, R. and Starke, H. (eds.), Fleas. Proc. Int. Conf. on fleas, Ashton Wold, Peterborough, UK, June 1977. A. A. Balkema, pp. 93–172.

Van der Mescht, L., Matthee, S. y Matthee, C.A. (2015) Comparative phylogeography between two generalist flea species reveal a complex interaction between parasite life history and host vicariance: parasite-host association matters. *BMC Evolutionary Biology*, 15: 105.

van Herwerden, L., Blair, D. y Agatsuma, T. (1998) Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology*, 116: 311–317.

Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. y Vieites, D.R. (2005) Comparative Performance of the 16S rRNA Gene in DNA Barcoding of Amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2: 5.

Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagburn, B.L., Bond, R., Denholm, I., Dryden, M.W., Payne, P., Rust, M.K., Schroeder, I., Vaughn, M.B. y Bledsoe, D. (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, 94: 219–226.

Von der Schulenburg, J.H., Hancock, J.M., Pagnamenta, A., Sloggett, J.J., Majerus, M.E. y Hurst, G.D. (2001) Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Molecular Biology and Evolution*, 18: 648–660.

Warberg, R., Jensen, K.T. y Frydenberg, J. (2005) Repetitive sequences in the ITS1 region of ribosomal DNA in congeneric microphallid species (Trematoda: Digenea). *Parasitology Research*, 97: 420–423.

- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. y Hebert, P.D. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360: 1847–1857.
- Wares, J.P. y Cunningham, C.W. (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 12: 2455–2469.
- Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W. y Dittmar, K. (2008) A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*, 24: 677–707.
- Yssouf, A., Socolovschi, C., Leulmi, H., Kernif, T., Bitam, I., Audoly, G., Almeras, L., Raoult, D. y Parola, P. (2014) Identification of flea species using MALDI-TOF MS. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37: 153–157.
- Yssouf, A., Almeras, L., Terras, J., Socolovschi, C., Raoult, D. y Parola, P. (2015) Detection of *Rickettsia* spp in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9: e0003473.
- Zagoskin, M.V., Lazareva, V.I., Grishanin, A.K. y Mukha, D.V. (2014) Phylogenetic information content of Copepoda ribosomal DNA repeat units: ITS1 and ITS2 impact. *BioMed Research International*, ID: 926342.
- Zaidi, F., Wei, S.J., Shi, M. y Chen, X.X. (2011) Utility of multigene loci for forensic species diagnosis of blowflies. *Journal of Insect Science*, 11: 59.
- Zhang, D.X. y Hewitt, G.M. (1997) Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6: 143–150.
- Zhu, Q., Hastriter, M.W., Whiting, M.F. y Dittmar, K. (2015) Fleas (Siphonaptera) are Cretaceous, and evolved with Theria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 90: 129–139.
- Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M., Gómez-López, M.S. y Cutillas, C. (2015) Molecular study of *Stenoponia tripectinata tripectinata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Stenoponiinae) from the Canary Islands: taxonomy and phylogeny. *Bulletin of Entomological Research*, 104: 704–711.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. y Cutillas, C. (2016a) *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*: introgressive hybridization?. *Systematic Entomology*, 41: 567–579.

Zurita, A., Gutiérrez, S.G., Cutillas, C. (2016b) Infection Rates of *Wolbachia* sp. and *Bartonella* sp. in Different Populations of Fleas. *Current Microbiology*, 73: 704–713.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M. y Cutillas, C. (2018a) Morphological and molecular study of the genus *Nosopsyllus* (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *Nosopsyllus barbarus* (Jordan y Rothschild 1912) as a junior synonym of *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc, d'Antic 1800). *Insect Systematic and Evolution*, 49: 81–101.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M. y Cutillas, C. (2018b) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Archaeopsylla erinacei* (Bouché, 1835). *Bulletin of Entomological Research*, doi: 10.1017/S0007485317001274.



CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

V.1. CONCLUSIONES GENERALES

1. Los análisis morfobiométricos y moleculares llevados a cabo en distintas especies del Orden Siphonaptera nos permiten concluir que las técnicas moleculares son una herramienta útil para los estudios taxonómicos y filogenéticos de estas especies.

2. Tras la amplificación y secuenciación del gen ribosómico 18S del ADNr en sifonápteros podemos concluir que no es una herramienta útil para discriminar a nivel de género, especie y subespecie, mientras que los marcadores ribosómicos ITS1 e ITS2, así como, los genes parciales *cox1* y *cytb* del ADNmt son marcadores útiles para caracterizar y discriminar a esos niveles taxonómicos.

3. Los espectros obtenidos mediante la técnica MALDI-TOF MS para las especies *C. felis*, *N. fasciatus*, *P. irritans* y *S. tripectinata*, nos permite concluir la utilidad de esta técnica para la diferenciación específica de pulgas conservadas en alcohol. Asimismo, esta técnica ha mostrado su utilidad en la detección de *Bartonella* sp. en pulgas.

4. La detección de patógenos en sifonápteros mediante la técnica cuantitativa qPCR ha mostrado ser la técnica de elección en el diagnóstico de los mismos.

5. La reducción o aumento en la diversidad del ADN mitocondrial presente en sifonápteros, requiere el estudio de la presencia de endosimbiontes como *W. pipientis*.

V.2. CONCLUSIONES SOBRE TAXONOMÍA CLÁSICA

6. Los distintos morfotipos observados en *C. felis* no se correspondieron con la presencia de diversidad haplotídica, por lo que concluimos que se hace necesario una

revisión de los criterios morfológicos utilizados hasta el momento para caracterizar dicha especie.

7. El estudio de la distribución y la posición de las setas del margen ventral del telómero de los machos y la presencia o ausencia de un lóbulo apical de tamaño variable en el margen posterior del esternito VII de las hembras en *N. barbarus* y *N. fasciatus* nos permite concluir que dichos caracteres no son válidos para el diagnóstico específico de ambas especies.

8. El número de setas presentes en el octavo tergito abdominal y el séptimo esternito abdominal de las hembras no son criterios válidos como caracteres diagnósticos para diferenciar entre *A. e. erinacei* y *A. e. maura*. Sin embargo, la longitud total de la espermateca de las hembras y la longitud total del basímero en los machos deberían ser consideradas como caracteres de referencia a la hora de discriminar entre ambas subespecies.

9. Tras los estudios morfológicos y biométricos llevados a cabo en *P. irritans* procedente de distintos hospedadores y distintas zonas geográficas, concluimos que estos análisis no nos permiten discriminar entre ambas poblaciones, siendo necesario llevar a cabo estudios moleculares.

V.3. CONCLUSIONES BASADAS EN LA TAXONOMÍA MOLECULAR Y FILOGENIA

10. La amplificación del gen parcial 18S ADNr y el gen parcial *cox1* del ADNmt en *S. t. tripectinata* nos permite concluir el origen monofilético de la subfamilia Stenoponiinae así como, un linaje genético diferente al de la familia Ctenophthamidae. Por lo tanto, se propone la elevación de la subfamilia Stenoponiinae al nivel de familia (Stenoponiidae).

11. Las secuencias *cox1* de *C. felis* revelaron cinco haplotipos diferentes, de los cuales dos de ellos se correspondían con *C. canis* sugiriendo una posible introgresión del ADN mitocondrial de *C. canis* en *C. felis* por la acción de *W. pipientis*. Estos resultados reafirman la conclusión número cinco sobre la necesidad del estudio de la presencia de este endosimbionte.

12. El estudio filogenético y molecular comparativo del ITS1, ITS2, *cox1*, *cytb* y secuencias concatenadas de *N. fasciatus* y *N. barbarus* nos permite concluir que no existen argumentos sólidos para considerar estas dos "morfo-especies" como dos especies diferentes por lo que, proponemos a *N. barbarus* como sinónimo joven de *N. fasciatus*.

13. Tras el estudio filogenético y molecular comparativo del ITS1, ITS2, *cox1*, *cytb* y secuencias concatenadas de *A. erinacei*, concluimos que existen dos linajes genéticos geográficos (Sevilla y Córcega) en esta especie que además se corresponden con dos subespecies diferentes (*A. e. erinacei* y *A. e. maura*) que pueden ser discriminadas por PCR-RFLP.

14. Los análisis moleculares y filogenéticos llevados a cabo en la especie *P. irritans* nos permiten concluir la presencia de dos linajes genéticos geográficos bien definidos (España y Argentina) dentro de la especie *P. irritans*, sugiriendo la existencia de dos especies crípticas que se discriminan mediante PCR-RFLP.

V.4. CONCLUSIONES EPIDEMIOLÓGICAS

15. Tras los estudios epidemiológicos llevados a cabo en *W. pipientis*, concluimos que la prevalencia de esta especie es mayor en hembras de *C. felis* que en los machos mientras que, la raza y el estilo de vida de los perros no son determinantes en dicha prevalencia.

16. La detección de *B. quintana*, *B. elizabethae* y *B. henselae* en *S. t. tripectinata*, nos permite concluir el papel vectorial de esta especie en las Islas Canarias y la Isla de Córcega. Asimismo, concluimos el papel vectorial de *N. fasciatus* para *B. elizabethae* y *B. henselae* en la Isla de Córcega y *P. irritans* para *Bartonella* sp. en la región de Andalucía.

17. La detección mediante qPCR de *R. felis* en *C. felis*, nos permite concluir que este patógeno está bien establecido en Andalucía siendo *C. felis* su reservorio y vector primario.

18. Tras la detección de *Mycobacterium* sp. en *C. felis* y *P. irritans* mediante la técnica qPCR concluimos la importancia de evaluar la presencia de este patógeno en sifonápteros.



CAPÍTULO VI. CONCLUSIONS

VI. CONCLUSIONS

VI.1. GENERAL CONCLUSIONS

1. Morphobiometric analyses carried out in different species belonging to Siphonaptera Order let us to conclude that molecular techniques are an useful tool for taxonomic and phylogenetic studies in these species.
2. The results based on amplification and sequencing of 18S rDNA in Siphonaptera Order, confirm that this marker is not an useful tool in order to discriminate at genus, species and subspecies level, while ITS1 and ITS2 ribosomal DNA together with *cox1* and *cytb* mtDNA partial gene are useful markers in order to characterize and discriminate at these taxonomic levels.
3. The spectra obtained by MALDI-TOF MS for *C. felis*, *N. fasciatus*, *P. irritans* and *S. tripectinata* species, let us to conclude the usefulness of this technique for the specific differentiation of fleas preserved in alcohol. Furthermore, this technique has showed its usefulness for the *Bartonella* sp. detection in fleas parasitizing animals, humans and livestock.
4. qPCR has showed to be the best method for pathogen detection in Siphonaptera Order.
5. The presence of endosymbionts as *W. pipientis* must be checked in fleas species showing disorders of mitochondrial DNA.

VI.2. CLASSIC TAXONOMIC CONCLUSIONS

7. The study of the distribution and position of the ventral margin setae of the telomere in males, and the presence or absence of an apical lobe of variable size in the posterior margin of sternum VII in females of *N. barbarus* and *N. fasciatus*, let us to conclude that these characters are not useful for the specific diagnosis of both species.

8. The number of bristles bearing in eighth abdominal tergum and seventh abdominal sternum of female specimens are not valid criteria as diagnostic characters in order to differentiate *A. e. erinacei* and *A. e. maura*. However, the total length of the spermatheca in females and the total length of basimere in males should be taking into account as characters of reference in order to discriminate between both subspecies.

9. Based on morphological and biometric studies carried out for *P. irritans* isolated from different hosts and different geographical areas, we conclude that these analyses do not discriminate between both populations. Thus, it is necessary to carry out molecular studies.

VI.3. CONCLUSIONS BASED ON MOLECULAR TAXONOMY AND PHYLOGENY

10. The amplification of 18S rDNA partial gene and *cox1* mtDNA partial gene in *S.t. tripectinata*, let us to conclude the monophyletic origin of Stenoponiinae subfamily as well as a different genetic lineage from Ctenophthalmidae family. Thus, we propose the elevation of subfamily Stenoponiinae to family level (Stenoponiidae).

11. The *cox1* mtDNA sequences of *C. felis* revealed five different haplotypes, out of which two of them corresponded with *C. canis*, suggesting a possible introgression of

C. canis coxI mtDNA into *C. felis* by *W. pipientis*. These results reinforce the conclusion number five about the necessity of study the presence of this endosymbiont.

12. The phylogenetic and molecular comparative study of ITS1, ITS2, *coxI*, *cytb* and concatenated sequences of *N. fasciatus* and *N. barbarus*, let us to conclude that there are no solid arguments to consider these two “morpho-species” as two different species, therefore, we propose *N. barbarus* as a junior synonym of *N. fasciatus*.

13. Based on the phylogenetic and molecular comparative study of ITS1, ITS2, *coxI*, *cytb* and concatenated sequences of *A. erinacei*, we conclude the existence of two geographical genetic lineages (Seville and Corse) in this species corresponding with two different subspecies (*A. e. erinacei* and *A. e. maura*), which could be discriminated by PCR-RFLP.

14. Molecular and phylogenetic analyses carried out in *P. irritans*, let us to conclude the presence of two well defined geographical genetic lineages (Spain and Argentina) in *P. irritans* species, suggesting the existence of two cryptic species which could be discriminated by PCR-RFLP.

VI.4. EPIDEMIOLOGICAL CONCLUSIONS

15. Based on epidemiologic studies, we conclude that the prevalence of *W. pipientis* is higher in female of *C. felis* than in male of the same species whereas, dog breeds and lifestyles are not determinants in this prevalence.

16. The detection of *B. quintana*, *B. elizabethae* y *B. henselae* in *S. t. tripectinata*, allow us to conclude the vector role of this species in the Canary Islands and Corse Island. Furthermore, we conclude the vector role of *N. fasciatus* for *B. elizabethae* and *B. henselae* in the Corse Island and *P. irritans* for *Bartonella* sp. in the Andalusian region.

17. The detection of *R. felis* in *C. felis* by qPCR, allow us to conclude that this pathogen is well established in Andalusian region being *C. felis* its primary vector and reservoir.

18. Based on the detection of *Mycobacterium* sp. in *C. felis* and *P. irritans* by qPCR, we conclude the importance to assess the presence of this pathogen in Siphonaptera Order.



ANEXO I. MATERIAL Y MÉTODOS

ANEXO I. MATERIAL Y MÉTODOS**A.I.1. MATERIAL**

El material objeto de estudio han sido adultos de distintas especies del Orden Siphonaptera aisladas de diferentes hospedadores y zonas geográficas (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de las especies de sifonápteros estudiadas en la presente Tesis Doctoral por especie hospedadora y zona geográfica.

Especie	Hospedador	Origen geográfico
<i>Stenoponia tripectinata</i> <i>tripectinata</i>	<i>Mus musculus</i>	España, Gran Canaria España, El Hierro España, La Gomera España, La Palma España, Tenerife España, Tarragona (Delta del Ebro) España, Barcelona (LLobregat) España, Barcelona (Montserrat)
<i>Ctenocephalides felis</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Irán, Mazandaran (Nashtarood) Irán, Mazandaran (Kotra) Irán, Mazandaran (Tonekabon) Sudáfrica, Limpopo (Polokwane) España, Cádiz (Sanlúcar de Barrameda) España, Mallorca España, Sevilla (Villamanrique de la Condesa) España, Sevilla (Lebrija) España, Sevilla (Pilas) España, Sevilla (La Luisiana) España, Sevilla (Dos Hermanas) España, Sevilla (Fuentes de Andalucía) España, Sevilla (Mairena) España, Granada (Dílar) Argentina, La Plata (Buenos Aires)
<i>Ctenocephalides canis</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Irán, Mazandaran (Kotra) Irán, Mazandaran (Tonekabon) Irán, Mazandaran (Nashtarood)
<i>Nosopsyllus barbarus</i>	<i>Rattus rattus</i>	España, Sevilla (Dos Hermanas)

	<i>Mus sp.</i>	España, Granada España, El Hierro Marruecos, Sidi bou rahba España, El Hierro
<i>Nosopsyllus fasciatus</i>	<i>Crocidura russula</i> <i>Rattus rattus</i> <i>Rattus norvegicus</i> <i>Mus spretus</i> <i>Apodemus sylvaticus</i> Roedores (Múridos sin identificar)	Francia, Île de Bananec Bélgica, Ampsin Portugal, Islas Azores (Flores) Portugal, Islas Azores (Terceira) Francia, Córcega (Piana) Francia, Córcega (Cavalo) Francia, Córcega (Ratino) Francia, Ile de Ré (Rivedoux plage) Portugal, Montemor-o-Velho Bélgica, Chertal Bélgica, Dinant (Herbucher)
<i>Xenopsylla cheopis</i>	<i>Rattus rattus</i>	España, El Hierro
<i>Archaeopsylla erinacei</i>	<i>Erinaceus europaeus</i>	España, Sevilla (Dos Hermanas) España, Sevilla (Aznalcázar) Francia, Córcega
<i>Pulex irritans</i>	Hospedador desconocido (Establo de caballos abandonado) <i>Lycalopex griseus</i> <i>Lycalopex culpaeus</i>	España, Sevilla Argentina, Santa Cruz (Parque Nacional Bosques Petrificados de Jaramillo) Argentina, Santa Cruz (Parque Nacional Bosques Petrificados de Jaramillo)

A.I.1.1. Recogida del material

Para la localización y extracción de las pulgas adultas, se realizó una inspección meticulosa, bien manualmente o mediante peinado y cepillado, de cabeza, cuello, cuerpo, costados, cola y regiones ventrales de cada especie hospedadora estudiada para determinar la ausencia o presencia de pulgas. Esta inspección se realizó unas veces *in situ* en el hábitat natural del hospedador, mientras que otras veces (cuando fue posible) se llevó a cabo en nuestro laboratorio. En cada hospedador positivo, los sifonápteros fueron extraídos con pinzas y depositados en un Eppendorf con alcohol de 70°. Los especímenes aislados por nuestro grupo de investigación, una vez en el laboratorio,

fueron lavados y desprovistos de restos procedentes del hospedador. Posteriormente, fueron depositados individualmente en tubos Eppendorf y almacenados en alcohol de 70° a temperatura ambiente hasta su posterior identificación. Por su parte, las muestras donadas por otros grupos colaboradores se mantuvieron en el medio de conservación en el cual se encontraban hasta su posterior identificación. El material facilitado por otros colaboradores científicos fue el siguiente (Tabla 1):

- *S. t. tripectinata*: Los especímenes de esta especie aislados de roedores (*M. musculus*) de diferentes zonas geográficas han sido donados por la Dra. María Soledad Gómez López y el Dr. Carlos Feliú de la Universidad de Barcelona.
- *C. felis* y *C. canis*: Los especímenes de ambas especies aislados de perros de Irán y Sudáfrica han sido donados por el Dr. Ali Halajian de la Universidad de Limpopo.
- *N. barbarus*: Las muestras de esta especie aisladas de la especie hospedadora *M. spretus* de Marruecos fueron donadas por el Dr. Roland Libois (Universidad de Liège).
- *N. fasciatus*: Todos los individuos de esta especie aislados de distintas especies hospedadoras de roedores fueron donados por el Dr. Roland Libois (Universidad de Liège) y el Dr. Jean Claude Beaucournu (Universidad de Rennes).
- *X. cheopis*: Los especímenes pertenecientes a esta especie aislados de roedores de la isla de El Hierro fueron donados por el Dr. Carlos Feliú de la Universidad de Barcelona.
- *A. erinacei*: Los sifonápteros de esta especie aislados de erizos de la isla de Córcega fueron donados por el Dr. Carlos Feliú de la Universidad de Barcelona.

- *P. irritans*: Los especímenes de esta especie procedentes de zorros de la provincia de Santa Cruz (Argentina) fueron donados por Alejandro Travani del Centro de Investigaciones Puerto Deseado (UNPA-CONICET, Argentina) y Alejandro Rodríguez del Departamento de Biología de la Conservación de la Estación Biológica de Doñana-CSIC, Sevilla, España.

A.I.2. MÉTODOS

A.I.2.1. Estudios biométricos y morfológicos de distintas especies pertenecientes al Orden Siphonaptera

Todos los sifonápteros estudiados en la presente Tesis Doctoral han sido analizados morfológicamente en nuestro laboratorio. Incluso para aquellas muestras donadas por nuestros colaboradores que ya habían sido clasificadas previamente, se procedió a su estudio morfológico con el fin de confirmar dicha clasificación inicial. Para llevar a cabo una primera identificación morfológica, los individuos fueron montados entre porta y cubreobjetos con etanol de 70° para ser posteriormente examinados y fotografiados bajo microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara fotográfica Nikon D90. Para algunas especies en las cuales la quetotaxia de los tres pares de patas no era un carácter taxonómico diferencial se procedió a la disección de las mismas para estudios moleculares, quedando el resto del cuerpo destinado a fines morfológicos y biométricos más detallados. Para transparentar y montar las pulgas de manera permanente, se utilizó el método de Lewis (1993) que consta de los siguientes pasos:

- Aclarado de las pulgas en una solución de KOH al 10 % durante 24-48 horas para que la muestra quede lo más transparente posible.

- Colocar la muestra en una solución de ácido acético glacial al 5-10 % durante 30-60 minutos para neutralizar el KOH del primer paso. Si no se van a requerir muestras montadas de manera permanente, después de este paso la muestra puede volver a conservarse en etanol y montarse con agua entre porta y cubre para su visualización al microscopio óptico cada vez que se desee.
- Realizar dos cambios de 30 minutos cada uno en alcohol absoluto.
- Someter las muestras a un tratamiento en una solución al 50 % de xilol y alcohol absoluto durante 60 minutos.
- Realizar 2 pasos de 60 minutos cada uno en xilol puro.
- Montar la muestra sobre porta y cubre utilizando medios de montaje diagnósticos como el bálsamo de Canadá o el EUKITT.

Una vez transparentadas y montadas las diferentes especies de pulgas fueron clasificadas y fotografiadas de nuevo utilizando el microscopio óptico Olympus BX51 y siguiendo las claves taxonómicas publicadas por diferentes autores (Jordan y Rothschild, 1912; Gil Collado, 1949, 1960; Hopkins y Rothschild, 1953, 1962; Barrera, 1955; Jordan, 1958; Smit, 1958; Lewis, 1967; Hastriter y Tipton, 1975; Beaucournu y Launay, 1990; Lewis, 1993; Giannetto y col., 1997; Beaucournu y Ménier, 1998; Ménier y Beaucournu, 1998; Acosta y Morrone, 2013; Marrugal y col., 2013).

Para el estudio biométrico realizado en algunas de las especies estudiadas se utilizaron entre 15-20 parámetros diferentes según la especie objeto de estudio. Esta parte del estudio taxonómico se realizó bajo el equipo microscópico Zeiss con un sistema de cámara clara y de fotografía. Se utilizó el programa BM® SPSS® Statistics version 24.0.0.0 (Pardo y Ruiz, 2002) para calcular los valores de desviación estándar,

media aritmética y coeficiente de variación de cada uno de los parámetros estudiados, además se usaron los programas ANOVA statistical test y Statistix versión 9.0, para calcular la varianza total, así como la varianza entre las distintas poblaciones estudiadas de manera que conozcamos qué valores biométricos pueden considerarse significativos. Las medias obtenidas para cada parámetro estudiado fueron comparadas entre individuos de distintas zonas geográficas y distintos sexos mediante el método de la mínima diferencia significativa de Fisher (MDS).

A.I.2.2. Estudios moleculares y filogenéticos de distintas especies pertenecientes al Orden Siphonaptera

A.I.2.2.1. Selección de marcadores moleculares

En la presente Tesis Doctoral, para llevar a cabo la caracterización molecular y el estudio filogenético de diferentes especies del Orden Siphonaptera se han utilizado los marcadores moleculares *cox1* y *cytb* del ADNmt y los marcadores moleculares ribosómicos 18S, ITS1 e ITS2. Para ello se ha estudiado cada marcador por separado, así como una combinación de los mismos (secuencias concatenadas).

A.I.2.2.2. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico de cada pulga adulta se realizó de manera individual siguiendo el protocolo del kit de extracción de ADN, *DNeasy® Blood & Tissue Handbook Kit* (QIAGEN), que comprende tres pasos principales y que se realiza utilizando columnas *DNeasy Mini spin* (Fig. 8). El proceso de extracción se basa en el empleo de una matriz que retiene los productos de la lisis celular y permite la obtención de un extracto de ADN de un modo rápido y sencillo. Como material de partida para la

extracción se utilizó el cuerpo completo del adulto o únicamente los tres pares de patas, dependiendo de la especie estudiada.

Protocolo de extracción de ADN

1. Colocar cada individuo, libre de restos del hospedador, en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y presionar con un pistilo estéril para tritararlo en su totalidad.
2. Añadir 180 μ l del tampón de lisis (tampón ATL, casa comercial QIAGEN) y 20 μ l de Proteinasa K. Incubar a 56°C hasta que el tejido esté completamente lisado, aproximadamente de 1 a 3 horas.
3. Añadir *ARNasa* (20mg/ml), mezclar fuertemente y seguidamente incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Agitar en un vórtex durante 15 segundos, añadir 200 μ l de tampón AL (QIAGEN) a la muestra y mezclar fuertemente. Posteriormente, añadir 200 μ l de etanol (96°-100°) y homogeneizar la muestra.
5. Añadir la mezcla a una columna *DNeasy Mini spin*. Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto. En este paso, el ADN de la muestra queda atrapado en la resina de QIAGEN.
6. Lavar con 500 μ l de tampón AW1 y centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto para hacerlo pasar a través de la resina.
7. Desechar el filtrado del primer lavado. Seguidamente, lavar con el tampón AW2 y centrifugar durante 3 minutos a 13.000 r.p.m. (para eliminar todos los posibles contaminantes que puedan interferir en reacciones posteriores). Desechar el filtrado y colocar la columna *DNeasy Mini spin* a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml.

8. Añadir 100 μ l de tampón AE y centrifugar a 8.000 r.p.m durante 1 minuto. Repetir este paso una segunda vez utilizando un tubo Eppendorf de 1,5 ml diferente, de modo que se obtenga un volumen de ADN más concentrado y otro volumen de ADN más diluido.
9. Finalmente, almacenar el ADN obtenido a -20°C hasta su posterior uso.

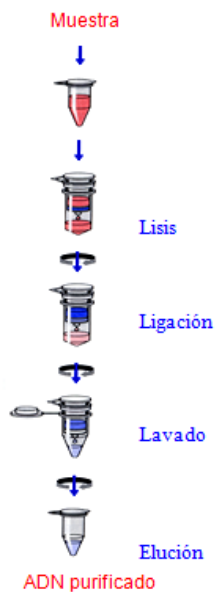


Figura 18. Esquema del procedimiento de extracción de ADN según el protocolo *DNeasy® Blood & Tissue Handbook* de QIAGEN.

A.I.2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la técnica de PCR estándar para llevar a cabo la amplificación de diferentes marcadores moleculares de distintas especies del Orden Siphonaptera. Tanto la mezcla de reactivos como el nombre de los cebadores y las condiciones de PCR utilizadas para cada marcador están resumidos en la tabla 2. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el termociclador *Master®cyclor ep gradient*.

A.I.2.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La finalidad de realizar una electroforesis es, por una parte, verificar el éxito de la extracción de ADN y por otra, para separar e identificar fragmentos de ADN en base

a su tamaño, con el fin de verificar la amplificación de dichos fragmentos tras la reacción de PCR.

El ADN es una molécula que posee carga negativa y, por tanto, cuando se coloca en un gel de agarosa y es sometido a un campo eléctrico (electroforesis) migra hacia el ánodo (polo positivo). Esta migración de las moléculas a través de la matriz del gel es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Así, los fragmentos pequeños de ADN migrarán más rápido, situándose más cercanos al ánodo, y los fragmentos grandes se desplazarán más lentamente, por lo que quedarán más próximos al cátodo.

La presencia de ADN se corrobora por la adición de bromuro de etidio al gel (Promega), el cual se intercala en la doble cadena del ADN y permite su visualización tras la exposición del gel a la luz ultravioleta entre 302-312 nm (Sambrook y Russell, 2001) mediante el uso de un transiluminador. El patrón de pesos moleculares que se utilizó fue el *DNA Molecular Weight Marker IX* (Roche) que contiene fragmentos de ADN de diez longitudes distintas: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281/271/, 234, 194, 118 y 72 pares de bases.

Para llevar a cabo la electroforesis se prepararon geles de agarosa (Sakem, LE Agarose) a concentraciones del 0,8 % para la visualización de ADN de extracción, y del 2 % para la visualización de ADN de amplificación.

Preparación de geles de agarosa

1. Pesar 0,28 g de agarosa (para geles al 0,8 %) ó 0,60 g de agarosa (para geles al 2 %) y añadir a 30 ml de tampón de electroforesis TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X. Calentar la mezcla en el microondas hasta su total disolución.

2. Tras templar la solución, añadir 1 µl de bromuro de etidio para la tinción del ADN. Seguidamente, volcar sobre el molde de la cubeta de electroforesis (BioRad) a la que previamente se ha colocado los peines que formarán los pocillos sobre los que se cargará la muestra. El gel solidifica a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.
3. Tras la solidificación, retirar los peines y colocar el gel en la cubeta de electroforesis sumergido en el mismo tampón TBE 0,5X, teniendo la precaución de recubrir totalmente la superficie del gel.
4. Preparar las muestras de ADN añadiendo 1/5 de su volumen final de tampón de carga.
5. Colocar las muestras en los pocillos formados en el gel y aplicar un voltaje de 90V. La electroforesis se lleva a cabo a voltaje constante, lo que nos permite separar los fragmentos de ADN por su tamaño.
6. Por último, fotografiar el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta a una longitud de onda de 360 nm con una cámara digital Kodak (*Gel Logic 100 Imaging System*) asociada al programa Kodak 1D 3.6.

Reactivos de electroforesis:

Tampón TBE 5X: Tris, 54g; Ácido bórico, 27,5g; EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 372g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

Tampón de carga Azul de bromofenol 0,25 % (p/v); Xileno-cianol 0,25 % (p/v); Ficoll tipo 400 en agua 15 %.

Solución de bromuro de etidio: Bromuro de etidio 10mg/ml en agua.

	ITS1	ITS2	18S	<i>Cytb</i>	<i>Cox1</i>
Mezcla de PCR					
PCR Buffer (5X)	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	10 µl
dNTPs (10mM)	2 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl	6 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Cebador directo (10 µM)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Cebador reverso (10 µM)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
ADN	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<i>goTaq</i> ADN polimerasa (Promega)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Autoclaved distilled water to	100 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Cebadores					
Cebador directo	NC5 (Gasser y col., 1996)	senITS2 (Vobis y col., 2004)	18SF (Kaewmongkol y col., 2011)	CytbF (Dittmar yWhiting, 2003)	LCO1490 (Folmer y col., 1994)
Cebador reverso	ITS1rev (Marrugal y col., 2013)	ITS2R (Luchetti y col., 2007)	18SR (Kaewmongkol y col., 2011)	A5F (Dittmar yWhiting, 2003)	HCO2198 (Folmer y col., 1994)
Condiciones de PCR					
Desnaturalización inicial	94 °C for 5´	94 °C for 5´	96 °C for 2´	95 °C for 12´	96 °C for 2´
Número de ciclos	35	35	45	30	40
Desnaturalización	94 °C for 30´´	94 °C for 60´´	94 °C for 50´´	95 °C for 30´´	94 °C for 30´´
Hibridación	58 °C for 30´´	55 °C for 60´´	58 °C for 60´´	40 °C for 30´´	50 °C for 30´´
Extensión de los cebadores	72 °C for 90´´	72 °C for 60´´	72 °C for 90´´	68 °C for 2´	72 °C for 60´´
Extensión final	72 °C for 5´	72 °C for 10´	72 °C for 10´	68 °C for 7´	72 °C for 7´

Tabla 2. Mezcla de reactivos, cebadores y condiciones de PCR utilizados para cada marcador molecular estudiado en la presente Tesis Doctoral.

A.I.2.2.5. Purificación y cuantificación del ADN amplificado

La purificación del ADN amplificado se realiza para eliminar los componentes de la reacción de PCR (cebadores, enzima, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), ADN, tampón) que puedan interferir en procesos posteriores.

La purificación de nuestro producto de PCR se realiza utilizando el kit de Promega, *QWizard®SV Gel and PCR Clean-Up System*, que nos permite extraer y purificar el ADN a partir del gel de agarosa y del producto de PCR directamente, sin necesidad de utilizar fenol o precipitación con etanol para la extracción del ADN. El método se basa en solubilizar la agarosa en presencia de isotiocianato de guanidina del tampón *Membrane Binding Solution* y la retención del ADN mediante las *SV Minicolumn*. Posteriormente, se lleva a cabo un proceso de lavado y finalmente el ADN es eluido con agua libre de nucleasas, lo que nos permite almacenarlo a -20° C. El ADN así purificado es útil para tratarlo con enzimas de restricción, o para los procesos posteriores de ligación, transformación, PCR y secuenciación.

Una vez purificado, es necesaria una cuantificación aproximada. Un método sencillo consiste en comparar la intensidad de la banda del ADN purificado con la de un marcador de tamaño y concentración conocidos. Además en algunos casos, para una cuantificación más precisa se ha utilizado el aparato *Nanodrop*.

Protocolo de Purificación

1. En caso de purificación del producto de PCR directamente, añadir un volumen igual de tampón *Membrane Binding Solution* y seguir directamente por el paso 6. Si por el contrario, vamos a purificar a través del aislamiento de la banda, pasar al paso 2.

2. Cargar el producto de PCR en un gel de agarosa/TBE al 2 % y realizar una electroforesis.
3. Cortar la banda que nos interesa y pasarla a un tubo Eppendorf de 1,5 ml previamente pesado.
4. Añadir tampón *Membrane Binding Solution* en proporción de 10µl por cada 10 mg de gel de agarosa.
5. Aplicar vórtex e incubar a 50-65° C durante 10 minutos o hasta que el gel esté completamente disuelto. Aplicar vórtex cada pocos minutos para facilitar la disolución del gel.
6. Colocar una columna de purificación en un tubo de colección, uno por cada muestra. Posteriormente, transferir la mezcla de gel disuelto o producto de PCR a la columna de purificación e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Centrifugar durante 1 minuto a 13.000 r.p.m. y eliminar el producto del tubo de colección.
8. Volver a colocar la columna de purificación en el tubo de colección y lavar la misma añadiendo 700 µl de *Membrane Wash Solution*, previamente diluido con etanol de 95°.
9. Centrifugar durante un minuto a 13.000 r.p.m. y eliminar el producto del tubo de colección.
10. Repetir el lavado con 500 µl de *Membrane Wash Solution*, centrifugando durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. Volver a centrifugar durante 1 minuto a 13.000 r.p.m para eliminar los residuos de etanol.

11. Cuidadosamente transferir la columna de purificación a un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml. Añadir 50 μ l de agua libre de nucleasas al centro de la columna e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Centrifugar durante 1 minuto a 13.000 r.p.m. y descartar la columna de purificación.
13. Almacenar el ADN eluído a 4° C o -20° C.

A.I.2.2.6. Secuenciación

Una vez purificado, el ADN se concentra en una centrífuga de vacío hasta un volumen final de 25 μ l. Para observar la concentración obtenida, se visualiza una alícuota de 1 μ l en un gel de agarosa/TBE al 2 % y se cuantifica con el aparato *Nanodrop*.

Una vez comprobada su concentración, las muestras de ADN purificado se envían a la empresa Stab Vida (Portugal) para que se proceda a la secuenciación de las mismas mediante un secuenciador automático (Licor). Todas las secuencias obtenidas en la presente Tesis Doctoral junto con sus números de acceso (GenBank) están desglosados en las tablas 3 y 4.

Los productos de PCR de los marcadores mitocondriales se secuenciaron directamente, sin embargo, para los productos de PCR de los marcadores ribosómicos, dada la presencia de múltiples operones, se realizó una clonación del ADN amplificado, previa a la secuenciación, con el fin estudiar las secuencias de los diferentes clones y así analizar la presencia de polimorfismos y la variabilidad intraindividual de la especie.

Tabla 3. Secuencias y números de acceso (GenBank) obtenidos para los diferentes marcadores moleculares de pulgas estudiados en la presente Tesis Doctoral.

Especie	Hospedador	Origen geográfico	18S	ITS1	ITS2	CoxI	Cytb
<i>S. t. tripectinata</i>	<i>M. musculus</i>	España, Gran Canaria	LK937066	LK937051-53, LN847260-62	LK937035-38, LN847258-59	LK937071-72	LN897472
		España, El Hierro	LK937067	LK937057-59	LK937042-44	LK937075-77	-
		España, La Gomera	LK937069	LK937060-62	LK937045-47	LK937078-80	-
		España, La Palma	LK937068	LK937054-56	LK937039-41	LK937073-74	-
		España, Tenerife	LK937070	LK937063-65	LK937048-50	LK937081-83	LN897473
<i>C. felis</i>	<i>C. l. familiaris</i>	Irán, Mazandaran (Nashtarood)	-	LN827902	LN827903	LN827896	-
		Irán, Mazandaran (Kotra)	LN651166	-	-	LN827896	LN897470
		Sudáfrica, Limpopo (Polokwane)	LN651166	-	LN827903	LN827900	LN899588
		España, Cádiz (Sanlúcar de Barrameda)	LN651166	-	LN827903-04, LN864484	LN827896	LN897470
		España, Mallorca	LN651166	-	LN827903	LN827896	LN897470
		España, Sevilla (Villamanrique de la Condesa)	LN651166	LN827902	LN827903	LN827896	LN897470
		España, Sevilla (Lebrija)	-	LN827902	LN827903	LN827896	-
		España, Sevilla (Pilas)	LN651166	LN827902	LN827903	LN827896	-
		España, Sevilla (La Luisiana)	LN651166	LN827902	LN827903	LN827896	-
		España, Sevilla (Dos Hermanas)	-	LN827902	LN827903	-	-
		España, Sevilla (Fuentes de Andalucía)	LN651166	LN827902	LN827903	LN827896, LN827898-99	LN897470, LN899587
		España, Sevilla (Mairena)	LN651166	-	LN827903	LN827896-97,	LN897470,

Material y Métodos

		España, Granada (Dílar) Argentina, Buenos Aires (La Plata)	LN651166 -	LN827902 LT853877	LN827903 LT853876	LN827899 LN827896 LT853879	LN899587 - LT853878
<i>C. canis</i>	<i>C. l. familiaris</i>	Irán, Mazandaran (Kotra) Irán, Mazandaran (Tonekabon) Irán, Mazandaran (Nashtarood)	LN651167 - -	- - -	LN827905, LN864485-87 LN827905 -	LN827901 - LN827901	LN897471, LN899589 - -
<i>N. barbarus</i>	<i>R. rattus</i>	España, Sevilla (Dos Hermanas) España, Granada España, El Hierro	LN881535 LN881536 LN881535	LN881538 LN881539, LN881543-44 LN881540	LN881537, LN881541-42 LN881537, LT703443-46 LN881537	LN881545-47 LN881548-52 LN881553	LN897460 LN897461-66 LN897467-69
<i>N. fasciatus</i>	<i>A. sylvaticus</i> <i>C. russula</i> Múrido	Bélgica, Chertal Francia, Île de Bananec Bélgica, Dinant (Herbucher)	LT158061 - LT158061	LT158054-55, LT703447 LT158053 LT158056-57	LT158059 LT158058 LT158060	LT158041-42 LT158040 LT604125-26	LT158043-44, LT158047 LT158052 LT158045-46, LT158048-51
<i>X. cheopis</i>	<i>R. rattus</i>	España, El Hierro	-	-	LT604121	-	LT604122
<i>A. erinacei</i>	<i>E. europaeus</i>	España, Sevilla (Dos Hermanas) Francia, Córcega	LT604111 LT703442, LT627347	LT604112-13 LT703437, LT627351	LT604114, LT745878-81 LT703438, LT627352, LT745882-85	LT604115-16 LT703439-40, LT627348-49	LT604117-20 LT703441, LT627350

<i>P. irritans</i>	Hospedador desconocido	España, Sevilla	LT797471	LT797452-63, LT853866-72	LT797448-50	LT797468-70	LT797473-74
	<i>L. griseus</i>	Argentina, Santa Cruz	LT797472	LT797464, LT853873-75	LT797451	LT797466	LT797480
	<i>L. culpaeus</i>	Argentina, Santa Cruz	LT797472	LT797464, LT853873-75	LT797451	LT797465, LT797467	LT797475-79, LT797481

Tabla 4. Números de acceso (GenBank) de las secuencias de patógenos detectados molecularmente en distintas especies de sifonápteros en la presente Tesis Doctoral.

Especie	Zona Geográfica	<i>Wolbachia</i> spp. (16S)	<i>Bartonella</i> spp. (Region its)
<i>C. felis</i>	España, Sevilla (Pilas) España, Sevilla (Villamanrique de la Condesa) España, Sevilla (Lebrija) España, Granada (Dílar) España, Sevilla (Fuentes de Andalucía) España, Sevilla (La Luisiana) España, Sevilla (Dos Hermanas) España, Sevilla (Mairena) España, Mallorca España, Cádiz (Sanlúcar de Barrameda) Sudáfrica, Limpopo (Polokwane) Irán, Mazandaran (Nashtarood)	LN864488	-
	<i>S. t. tripectinata</i>	España, La Palma España, El Hierro España, Tenerife	LN847263

A.I.2.2.7. Clonación y transformación del ADN amplificado

La técnica conocida por clonación, o tecnología del ADN recombinante consiste básicamente en insertar un determinado fragmento de ADN, en un vector; un plásmido, ADN vírico o un fago. A continuación, el plásmido se introduce en una célula huésped, las cuales se replican y a la vez también lo hace el vector con el fragmento de ADN foráneo. Después, tras la selección de colonias aisladas que porten moléculas de ADN recombinante (clones), se purifica el plásmido y se determinan la secuencia de nucleótidos del ADN de interés que se introdujo en el plásmido (Sambrook y col., 1989; Cerdan y col., 1997).

Todos los vectores de clonación deben contener secuencias que les permitan replicarse dentro de la célula hospedadora compatible. Además, poseen al menos un sitio de clonación, que consiste en una secuencia que puede ser cortada por una endonucleasa de restricción, lo que permite la inserción específica en este sitio del ADN extraño. Algunos vectores contienen varios de estos puntos agrupados juntos en un sitio de clonación múltiple.

Los plásmidos bacterianos son moléculas naturales de ADN de doble cadena circular (1 kb a más de 200 kb) que se encuentran en bacterias y algunos eucariotas unicelulares, como las levaduras. Tienen la capacidad de replicarse autónomamente y, frecuentemente, portan genes que confieren resistencia a antibióticos, tales como la tetraciclina y la ampicilina, sin embargo, requiere del enzima y proteína codificada por el hospedador para su replicación y transcripción. Para realizar esta técnica seguimos el protocolo descrito por Cutillas y col. (2009), el cual consta de dos fases principales: Ligación y transformación.

1. Ligación

El proceso de ligación consiste en la unión de los dos fragmentos de ADN *in vivo* dando como resultado moléculas de ADN recombinante que serán introducidas en células hospedadoras. En nuestros estudios hemos utilizado como vector el *pGEM[®]-T-Easy* (Promega, 1997) que presenta en ambos extremos 3' timinas, favoreciendo así la ligación de los productos de PCR generados por ciertas polimerasas como la *taq* polimerasa, que añade a los extremos del fragmento amplificado deoxiadenosina, dando lugar a extremos cohesivos.

Estos vectores contienen promotores de la T7 y SP6 polimerasa flanqueando los múltiples lugares de clonación (MCS) dentro del α -péptido que codifica la región del enzima β -galactosidasa. El inserto inactiva este gen dando lugar a clones recombinantes que pueden ser identificados directamente. La región de clonación múltiple incluye sitios de restricción que permite la liberación del inserto por digestión con el enzima de restricción *EcoRI*, *BstZI* y *NotI* (Fig. 9).

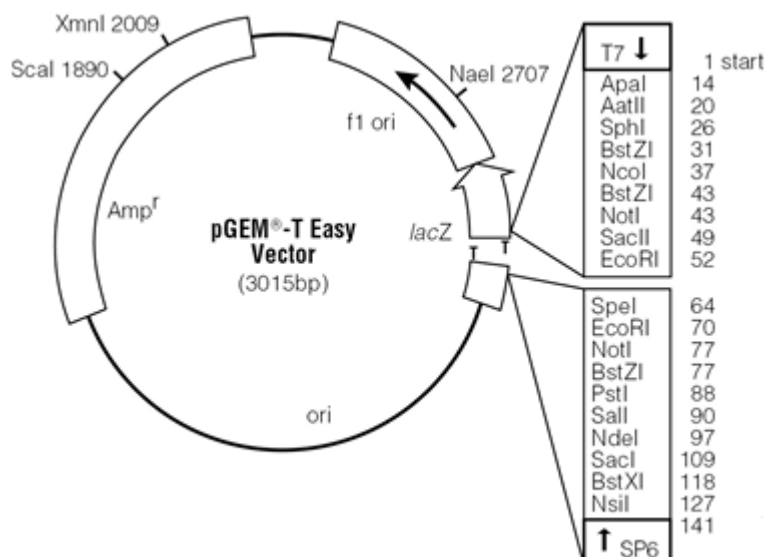


Figura 19. Vector *pGEM[®]-T Easy*

El vector *pGEM[®]-T-Easy* ha sido optimizado para usar en una relación molar inserto:vector de 1:1, pero incluso relaciones molares de 8:1 y 1:8 pueden llegar a ser

efectivas. Para el cálculo de la cantidad de producto de PCR se usó la fórmula propuesta por Promega:

$$\frac{\text{Ng Vector} \times \text{Tamaño (Kb) Inserto}}{\text{Tamaño (Kb) Vector}} \times \text{Relación Molar Inserto: Vector} = \text{ng Inserto}$$

Una vez conocida la cantidad que debemos utilizar, se realiza la reacción de ligación según Promega (1997) (Tabla 5) y la mezcla se incuba toda la noche a 4°C.

Tabla 5. Reactivos y volumen usados en la reacción de Ligación.

Tampón de Ligación 2x	5 µl
Vector pGEM [®] T-Easy (50 ng)	1 µl
Producto PCR	3 µl
T4 ADN Ligasa	1 µl
H ₂ O estéril c.s.p.	10 µl

2. Transformación

Para la transformación hemos utilizado células competentes de la cepa DH5α de *Escherichia coli*, previamente tratadas con Cl₂Ca (Sambrook y col., 1989). Los plásmidos, con el inserto obtenidos de la reacción de ligación, son introducidos en estas células con capacidad de captar ADN de la solución que las rodea. Para ello, se ponen

en contacto el plásmido con el inserto y la solución de células competentes, y se somete a shock térmico para favorecer el proceso.

El vector *pGEM[®]T-Easy* posee un gen de resistencia a la ampicilina y el fragmento *LacZ'* que codifica para el enzima β -galactosidasa, que hidroliza el compuesto cromogénico X-gal (5 bromo-4 Cloro-3 indolil- β -galactósido) liberando galactosa y un compuesto azul. En el *Lac Z'* se ha creado un sitio de clonación múltiple o MCS (*Multiple Cloning Site*), donde están presentes sitios de corte únicos para varios enzimas de restricción y donde se introduce el ADN exógeno. Estos sitios de corte, permitirán la liberación del ADN clonado, mediante tratamiento con los enzimas de restricción adecuados.

Las bacterias transformadas con este tipo de plásmidos en el medio de Luria Bertani (LB) con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), ampicilina y X-gal se reconocen por dar colonias resistentes al antibiótico de color azul pues producen β -galactosidasa funcional, mientras que si el plásmido lleva ADN exógeno, las colonias resultantes carecerán del color azul pues el fragmento génico *Lac Z'* está interrumpido. El IPTG es un inductor de la síntesis de β -galactosidasa en *E. coli*. De esta manera podremos diferenciar las colonias que han recibido nuestro ADN (color blanco) de las que no lo han recibido (color azul).

Protocolo de Transformación

El trabajo se realiza en campana de flujo laminar y los reactivos mantenidos en hielo.

1. Añadir 75 μ l de células competentes al producto de ligación y mantener en hielo durante 20 minutos agitando de vez en cuando.
2. Incubar la mezcla durante 2 minutos a 42° C.

3. Mantener durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir la mezcla a un tubo estéril con 2 ml de medio de cultivo LB líquido e incubar durante 1 hora a 37° C en agitación.
5. Centrifugar el cultivo durante 3 minutos a 8.000 r.p.m. y eliminar el sobrenadante. Seguidamente resuspender el pellet con los restos de medio que quede en las paredes.
6. Añadir a las placas LB-ampicilina 40µl de IPTG y 20µl de X-Gal ayudado de un asa triangular.
7. Sembrar el pellet en la placa LB-ampicilina e incubar a 37° C durante 16-24 h.

Reactivos para transformación:

X-Gal: 100mg de X-gal en 500 µl de Dimetilformamida. Conservación a -20° C en papel aluminio.

IPTG: 100 mg de Isopropylβ-D-1Thiogalactopyranoside al 98 % en 500 µl de agua bidestilada estéril. Conservación a -20° C.

Ampicilina (100 mg/ml): 0,100 g en 1 ml de agua bidestilada estéril. Conservación a -20° C.

En la placa LB-ampicilina deberán crecer las células que han incorporado el plásmido ya que éste las hace resistentes al antibiótico. Para comprobar que esas colonias de color blanco han recibido nuestro ADN, tenemos que proceder a la purificación del plásmido recombinante.

Aislamiento del plásmido recombinante

Este proceso se llevó a cabo con el kit comercial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purificación System* (Promega). Está basado inicialmente en una lisis alcalina modificada, seguida de una ligación del plásmido a la membrana de la *SV Minipreps column*. El ARN, proteínas y otras impurezas son eliminadas del medio y el plásmido es eluído con agua libre de nucleasas.

Protocolo de aislamiento del plásmido recombinante

1. De cada colonia blanca aislada, sembrar una placa de LB-Ampicilina, para obtener masa de cada clon. Incubar toda la noche a 37° C.
2. Sembrar las colonias seleccionadas en 1ml de LB-Ampicilina e incubar a 37° C, en agitación, durante toda la noche.
3. Centrifugar el cultivo a 8.000 r.p.m. durante 5 minutos, obteniéndose un sedimento de células.
4. Eliminar el medio (sobrenadante), y resuspender el sedimento con 250 µl de *Cell Resuspension Solution* en un Eppendorf de 1,5 ml.
5. Seguidamente añadir 250 µl de *Cell Lysis Solution* a cada muestra y mezclar por inversión del Eppendorf con la muestra (4 veces).
6. Añadir 10 µl de *Alkaline Protease Solution* a cada muestra e invertir cuatro veces para mezclar. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 350 µl de *Neutralization Solution* y mezclar de nuevo por inversión.
8. Centrifugamos a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente.

9. Insertar la Columna Spin en el tubo de colección y transferir el sobrenadante a la columna.
10. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y reinsertar la columna en el tubo de colección.
11. Añadir 750 µl de *Wash Solution*. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y reinsertar la columna en el tubo de colección.
12. Repetir el paso 10 con 250 µl de *Wash Solution*.
13. Centrifugar a 13.000 r.p.m durante 2 minutos a temperatura ambiente.
14. Transferir cuidadosamente la Columna Spin a un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml.
15. Añadir 100 µl de agua libre de nucleasas a la Columna Spin e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto a temperatura ambiente, descartar la Columna Spin y almacenar el ADN a -20° C.

Finalmente, para liberar el inserto del vector, tratamos con el enzima de restricción *EcoRI*, que corta a ambos lados del inserto. El protocolo para la digestión fue el recomendado por el fabricante (Promega) y se presenta en la tabla 6.

Esta mezcla se deja incubar de 1-3 horas a 37° C. Pasado este tiempo, realizamos una electroforesis en gel de agarosa en TBE al 2 %, con bromuro de etidio y en presencia de un marcador de pesos moleculares. El desarrollo de dicha electroforesis nos dará dos bandas: la banda alta, correspondiente al vector y otra banda baja, de

tamaño igual al fragmento amplificado. En la presente Tesis Doctoral, en el caso de los marcadores ribosómicos ITS1 e ITS2 se secuenciaron al menos tres clones de cada individuo.

Tabla 6. Reactivos utilizados para la liberación del inserto con el enzima de restricción *EcoRI*.

<i>EcoRI</i>	1 μ l
Tampón 10x	2 μ l
ADN (plásmido)	5 μ l
H ₂ O c.s.p.	20 μ l

A.I.2.2.8. Análisis de las secuencias

El alineamiento y los análisis de las secuencias se llevaron a cabo utilizando los programas *Clustal X version 2.0* (Larkin y col., 2007), *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (Altschul y col., 1990), *MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation)* (Edgar, 2004) y *MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5.2* (Tamura y col., 2011). Se obtuvo manualmente para cada muestra la secuencia consenso de las lecturas de los dos cebadores. Estas aplicaciones permitieron la comparación de las secuencias obtenidas entre ellas y con secuencias extraídas de las bases de datos de ADN (GenBank), así como el cálculo de los parámetros de longitud, composición en bases nucleotídicas (mutaciones y deleciones) y el porcentaje de variabilidad. En algunos casos para detectar la presencia de regiones repetitivas dentro de una misma secuencia se utilizó el programa *DOTMATCHER* (Rice y col., 2000).

También se utilizó el modelo de distancias K2P (*Kimura 2 parameter*) para establecer por medio de la regla del 10X establecida por Hebert y col. (2003) el umbral de divergencia nucleotídica por encima del cual dos linajes genéticos diferenciados pueden ser considerados como especies distintas.

Se han realizado diferentes alineamientos con el fin de analizar:

1. Similitud intraindividual: Se basa en estudiar las secuencias de distintos clones de un mismo individuo con el fin de observar si existe variación ó microheterogeneidad entre ellos.
2. Similitud intraespecífica: Se basa en conocer el nivel de similitud entre secuencias de individuos de una misma especie. Dentro de ésta, a su vez se estudió la variabilidad intrapoblacional (individuos de una misma población y una misma especie) y la variabilidad interpoblacional (individuos de una misma especie pero de diferentes poblaciones de origen).
3. Similitud interespecífica: Se basa en conocer el nivel de similitud entre secuencias de un mismo marcador molecular para individuos de diferentes especies.
4. Enzimas de Restricción: A las secuencias de ciertos marcadores y para ciertas poblaciones o especies se les realizó un mapeo de los enzimas de restricción con la aplicación online *Sequence Manipulation Suite* (Stothard, 2000) con el fin de encontrar aquellos enzimas que nos puedan servir para una diferenciación rápida entre poblaciones y especies a través de la técnica PCR-RFLP (PCR ligada a enzimas de restricción).

A.I.2.2.9. Análisis filogenéticos

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) llevándose a cabo la selección de un modelo mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC) (Huelsenbeck y Rannala, 1997; Posada y Buckley, 2004). A partir de estos modelos se reconstruyen árboles filogenéticos.

Por otro lado, todo árbol filogenético necesita ser enraizado al menos con un grupo externo (*outgroup*), es decir, una secuencia o secuencias que estén relacionadas de forma distante con las secuencias de interés para el análisis. En nuestro caso, para los análisis filogenéticos realizados dentro del Orden Siphonaptera se eligieron como grupos externos distintas especies del Orden Mecoptera y Díptera (Tabla 7).

Tabla 7: Número de acceso, longitud de la secuencia, gen o región amplificada y hospedador de los taxones utilizados para la reconstrucción de los árboles filogenéticos presentados en la presente Tesis Doctoral. Pb= pares de bases.

SIPHONAPTERA, MECOPTERA Y DÍPTERA					
Especie	Familia	Hospedador	Número de acceso	Gen o región	Longitud de la secuencia (pb)
<i>Aetheca wagneri</i>	Ceratophyllidae	<i>Peromyscus maniculatus</i>	EU336040	18S	1.880
<i>Ceratophyllus petrochelidoni</i>	Ceratophyllidae	<i>Petrochelidon pyrrhonota</i>	AF423888	18S	1.878
<i>Jellisonia amadoi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891260	18S	1.786
<i>Ceratophyllus hirundinis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891203	18S	1.831
<i>Ceratophyllus gallinae</i>	Ceratophyllidae	<i>Woodpecker nest</i>	EU336041	18S	1.870
<i>Ceratophyllus idius</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891204	18S	710
<i>Ceratophyllus rusticus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891205	18S	711
<i>Citellophilus tesquorum mongolicus</i>	Ceratophyllidae	<i>Citellus dauricus dauricus</i>	EU336103	18S	1.880
<i>Dactylopsylla bluei bluei</i>	Ceratophyllidae	<i>Thomomys bottae</i>	EU336124	18S	1.848
<i>Foxella ignota</i>	Ceratophyllidae	<i>Thomomys</i> sp.	EU336030	18S	1.880
<i>Jellisonia guerrerensis</i>	Ceratophyllidae	<i>Oryzomys alfaroi</i>	EU336107	18S	1.868
<i>Paraceras crispum</i>	Ceratophyllidae	<i>Sciurotamias davidianus</i>	EU336075	18S	1.866
<i>Megabothris abantis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	EU336049	18S	1.880
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891226	18S	711
<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891228	18S	1.824
<i>Orchopeas agilis</i>	Ceratophyllidae	<i>Neotoma lepida</i>	EU336028	18S	1.880
<i>Amphipsylla sibirica sibirica</i>	Leptopsyllidae	<i>Clethrionomys rutilus</i>	EU336061	18S	1.880
<i>Peromyscopsylla hamifer vigens</i>	Leptopsyllidae	<i>Microtus</i> sp.	EU336104	18S	1.880

<i>Peromyscopsylla selensis</i>	Leptopsyllidae	<i>Peromyscus maniculatus</i>	EU336043	18S	1.867
<i>Leptopsylla segnis</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	DQ298442	18S	1.866
<i>Peromyscopsylla silvatica</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	EU336065	18S	1.868
<i>Ophthalmopsylla kiritschenkovi</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	KM891233	18S	1.788
<i>Ophthalmopsylla jettmari</i>	Leptopsyllidae	<i>Citellus dauricus dauricus</i>	EU336101	18S	1.881
<i>Ophthalmopsylla volgensis palestina</i>	Leptopsyllidae	<i>Jaculus jaculus</i>	AF423895	18S	1.879
<i>Ischnopsyllus indicus</i>	Ischnopsyllidae	Desconocido	KM891230	18S	711
<i>Stenoponia americana</i>	Stenoponiidae	<i>Peromyscus leucopus</i>	AF423893	18S	1.877
<i>Stenoponia sidimi</i>	Stenoponiidae	<i>Clethrionomys rufocans</i>	EU336078	18S	1.869
<i>Stenoponia tripectinata medialis</i>	Stenoponiidae	<i>Gerbillus dasyurus</i>	EU336050	18S	1.880
<i>Stephanocircus dasyuri</i>	Stephanocircidae	<i>Isoodon obesulus</i>	EU336085	18S	1.880
<i>Stephanocircus pectinipes</i>	Stephanocircidae	<i>Pseudomys novaehollandae</i>	EU336088	18S	1.880
<i>Neopsylla bidentatiformis</i>	Ctenophthalmidae	<i>Cricetulus triton</i>	EU336074	18S	1.862
<i>Catallagia borealis</i>	Ctenophthalmidae	<i>Clethrionomys gapperi</i>	EU336100	18S	1.874
<i>Catallagia decipiens</i>	Ctenophthalmidae	<i>Microtus</i> sp.	EU336058	18S	1.862
<i>Ctenophthalmus pseudagyrtes</i>	Ctenophthalmidae	<i>Condylura cristata</i>	AF423892	18S	1.875
<i>Ctenophthalmus sanborni</i>	Ctenophthalmidae	<i>Habromys lophurus</i>	EU336067	18S	1.864
<i>Megarhthroglossus divivus</i>	Ctenophthalmidae	<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	AF286276	18S	1.877
<i>Conorhinopsylla stanfordi</i>	Ctenophthalmidae	<i>Glaucomys volans</i>	EU336127	18S	1.878
<i>Rhadinopsylla difficilis</i>	Ctenophthalmidae	<i>Vole nest</i>	EU336044	18S	1.880
<i>Rhadinopsylla masculana</i>	Ctenophthalmidae	<i>Gerbillus dasyurus</i>	EU336056	18S	1.868
<i>Jordanopsylla becki</i>	Ctenophthalmidae	<i>Neotoma lepida</i>	EU336071	18S	1.868
<i>Cartereta clavata</i>	Ctenophthalmidae	<i>Peromyscus eremiens</i>	EU336072	18S	1.868
<i>Corypsylla ornata</i>	Ctenophthalmidae	<i>Scapanus orarius</i>	EU336092	18S	1.867
<i>Anomiopsyllus amphibolus</i>	Ctenophthalmidae	<i>Peromyscus eremicus</i>	EU336036	18S	1.881
<i>Stenistomera alpina</i>	Ctenophthalmidae	<i>Neotoma lepida</i>	EU336037	18S	1.878
<i>Chiliopsylla allophyla allophyla</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	EU336094	18S	1.848
<i>Ctenophthalmus formosanus</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eothenomys melanogaster</i>	EU336131	18S	1.862
<i>Neotyphloceras crassipina chilensis</i>	Ctenophthalmidae	<i>Abrocoma bennetti</i>	EU336079	18S	1.879
<i>Dinopsyllus ellobius</i>	Ctenophthalmidae	<i>Mastomys natalensis</i>	EU336070	18S	1.868
<i>Corrodopsylla birulai</i>	Ctenophthalmidae	<i>Sorex araneus</i>	EU336063	18S	1.879
<i>Corrodopsylla curvata curvata</i>	Ctenophthalmidae	<i>Sorex</i> sp.	EU336064	18S	1.879
<i>Catallagia</i> sp.	Ctenophthalmidae	<i>Scapanus orarius</i>	AF423890	18S	1.846
<i>Epitedia wenmanni</i>	Ctenophthalmidae	<i>Thomomys bottae</i>	EU336033	18S	1.867
<i>Meringis dipodomys</i>	Ctenophthalmidae	<i>Dipodomys merriami</i>	EU336032	18S	1.874
<i>Meringis hubbardi</i>	Ctenophthalmidae	<i>Perognathus parvus</i>	AF423891	18S	1.872
<i>Nearctopsylla traubi</i>	Ctenophthalmidae	<i>Scapanus townsendii</i>	EU336093	18S	1.803
<i>Tunga libis</i>	Tungidae	<i>Phyllotis andium</i>	EU336114	18S	1.868
<i>Tunga monositus</i>	Tungidae	<i>Peromyscus crinitis</i>	EU336034	18S	1.880
<i>Tunga penetrans</i>	Tungidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	EU336115	18S	1.868
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Speotyto cunicularia</i>	AF423915	18S	1.879
<i>Parapulex chephrensis</i>	Pulicidae	<i>Acomys cahirinus</i>	EU336052	18S	1.880
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Pulicidae	<i>Rattus exulans</i>	EU336038	18S	1.881
<i>Xenopsylla robertsi</i>	Pulicidae	Desconocido	KM891147	18S	1.793
<i>Xenopsylla cucicularis</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	EU336098	18S	1.869
<i>Cediopsylla inaequalis inaequalis</i>	Pulicidae	<i>Vulpes macrotus</i>	EU336042	18S	1.869
<i>Archaeopsylla erinacei</i>	Pulicidae	Desconocido	X89486	18S	1.926
<i>Hoplopsyllus anomalus</i>	Pulicidae	<i>Spermophilus variegatus</i>	EU336047	18S	1.881
<i>Hoplopsyllus anomalus</i>	Pulicidae	Desconocido	AY521849	18S	1.902
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	EU336097	18S	1.881
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	Mammal	JN008928	18S	1.110
<i>Echidnophaga gallinacea</i>	Pulicidae	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	EU336055	18S	1.881
<i>Echidnophaga iberica</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	EU336099	18S	1.882
<i>Echidnophaga myrmecobii</i>	Pulicidae	Mammal	JN008929	18S	1.118
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulicidae	Desconocido	KC177274	18S	1.884
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	Desconocido	AF423914	18S	1.878
<i>Hystrichopsylla orophila</i>	Hystrichopsyllidae	Desconocido	EU336128	18S	1.766
<i>Hystrichopsylla schefferi</i>	Hystrichopsyllidae	<i>Aplodontia rufa</i>	EU336084	18S	1.878
<i>Lycopsylla nova</i>	Pygiopsyllidae	<i>Sarcophilus lanarius</i>	EU336132	18S	1.828
<i>Pygiopsylla hoplia</i>	Pygiopsyllidae	<i>Isoodon obesulus</i>	EU336086	18S	1.880
<i>Pygiopsylla hilli</i>	Pygiopsyllidae	Mamífero	JN008926	18S	1.120
<i>Pygiopsylla tunnexi</i>	Pygiopsyllidae	Mamífero	JN008933	18S	1.116
<i>Acanthopsylla jordani</i>	Pygiopsyllidae	Mamífero	JN008925	18S	1.102
<i>Acanthopsylla rothschildi rothschildi</i>	Pygiopsyllidae	Mamífero	AF286283	18S	1.878
<i>Anopheles farauti</i>	Culicidae	-	AF121054	18S	2.046
<i>Anopheles arabiensis</i>	Culicidae	-	AF417777	18S	799
<i>Nannochorista dipteroides</i>	Nannochoristidae	-	AF334796	18S	1.878
<i>Boreus coloradensis</i>	Boreidae	-	AF286285	18S	1.879
<i>Panorpa striata</i>	Panorpidae	-	AF423911	18S	1.876
<i>Neopanorpa harmandi</i>	Panorpidae	-	AF423903	18S	1.890
<i>Echidnophaga gallinacea</i>	Pulicidae	<i>Gallus gallus domesticus</i>	EU169199	ITS1	1.105
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	HF563590	ITS1	671

<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	LN827902	ITS1	668
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Pulicidae	Desconocido	DQ295061	ITS1	890
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Pulicidae	Desconocido	DQ295060	ITS1	890
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	<i>Felis silvestris catus</i>	EU170157	ITS1	760
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Homo sapiens</i>	EU169198	ITS1	929
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Homo sapiens</i>	GQ387496	ITS1	948
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	Desconocido	KX822017	ITS1	1.208
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LK937053	ITS1	1.205
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LK937057	ITS1	1.207
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Mus musculus</i>	LK937062	ITS1	1.207
<i>Tunga penetrans</i>	Tungidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	EU169194	ITS1	877
<i>Tunga penetrans</i>	Tungidae	<i>Homo sapiens</i>	EU169197	ITS1	1.075
<i>Tunga penetrans</i>	Tungidae	<i>Homo sapiens</i>	EU169196	ITS1	867
<i>Citellophilus tesquorum altaicus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	EU770312	ITS1	1.456
<i>Citellophilus tesquorum dzetyuensis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	EU770316	ITS1	1.450
<i>Nosopsyllus barbarus</i>	Ceratophyllidae	<i>Rattus</i> sp.	LN881538	ITS1	1.100
<i>Nosopsyllus barbarus</i>	Ceratophyllidae	<i>Rattus</i> sp.	LN881539	ITS1	1.100
<i>Nosopsyllus fasciatus</i>	Ceratophyllidae	<i>Apodemus sylvaticus</i>	LT158055	ITS1	1.100
<i>Nosopsyllus fasciatus</i>	Ceratophyllidae	<i>Crocidura russula</i>	LT158053	ITS1	1.100
<i>Anopheles moucheti nigrensensis</i>	Culicidae	-	AM232662	ITS1	648
<i>Anopheles moucheti beruoetsi</i>	Culicidae	-	AM232663	ITS1	629
<i>Anopheles farauti</i>	Culicidae	-	EF042735	ITS1	1.435
<i>Anopheles arabiensis</i>	Culicidae	-	DQ287692	ITS1	1.027
<i>Ophthalmopsylla kirtschenkoii</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	GQ161960	ITS2	474
<i>Ophthalmopsylla extrema</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	GQ161956	ITS2	466
<i>Amphipsylla quadratoides quadratoides</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	AY072642	ITS2	497
<i>Leptopsylla</i> sp.	Leptopsyllidae	Desconocido	EF504221	ITS2	459
<i>Leptopsylla</i> sp.	Leptopsyllidae	Desconocido	EF504223	ITS2	449
<i>Neopsylla siboi</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	AF353113	ITS2	479
<i>Neopsylla teratura</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	AF353122	ITS2	479
<i>Neopsylla stevensi</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	AY337033	ITS2	479
<i>Neopsylla specialis</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	AF353120	ITS2	479
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Pulicidae	<i>Rattus</i> sp.	DQ295061	ITS2	356
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Pulicidae	<i>Rattus</i> sp.	DQ295059	ITS2	356
<i>Tunga penetrans</i>	Tungidae	<i>Homo sapiens</i>	DQ844716	ITS2	471
<i>Tunga penetrans</i>	Tungidae	<i>Homo sapiens</i>	DQ844724	ITS2	473
<i>Tunga trimamillata</i>	Tungidae	Desconocido	AY425820	ITS2	470
<i>Citellophilus tesquorum dzetyuensis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	EU770316	ITS2	332
<i>Citellophilus tesquorum altaicus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	EU770312	ITS2	332
<i>Anopheles farauti</i>	Culicidae	-	AF030406	ITS2	565
<i>Anopheles arabiensis</i>	Culicidae	-	DQ287692	ITS2	1.027
<i>Echidnophaga</i> sp.	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	JN008922	<i>Cox1</i>	654
<i>Echidnophaga gallinacea</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	JN008921	<i>Cox1</i>	650
<i>Echidnophaga myrmecobii</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	JN008919	<i>Cox1</i>	649
<i>Echidnophaga iberica</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479239	<i>Cox1</i>	658
<i>Echidnophaga</i> sp.	Pulicidae	Mamífero	JN008922	<i>Cox1</i>	654
<i>Echidnophaga ambulans ambulans</i>	Pulicidae	<i>Tachyglossus aculeatus</i>	KR363632	<i>Cox1</i>	601
<i>Xenopsylla cucicularis</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479238	<i>Cox1</i>	658
<i>Xenopsylla robertsi</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890906	<i>Cox1</i>	1.179
<i>Xenopsylla conformis conformis</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890988	<i>Cox1</i>	1.218
<i>Xenopsylla skrjabini</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890983	<i>Cox1</i>	1.218
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Meles meles</i>	KF479246	<i>Cox1</i>	658
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Meles meles</i>	KF479247	<i>Cox1</i>	658
<i>Pulex irritans</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KY048351	<i>Cox1</i>	658
<i>Pulex</i> sp.	Pulicidae	Desconocido	KM891015	<i>Cox1</i>	1.251
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479234	<i>Cox1</i>	658
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479235	<i>Cox1</i>	658
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479236	<i>Cox1</i>	658
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479237	<i>Cox1</i>	658
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	Mamífero	JN008918	<i>Cox1</i>	652
<i>Synopsyllus girardi</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890952	<i>Cox1</i>	1.251
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulicidae	Mamífero	JN008917	<i>Cox1</i>	652
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684893	<i>Cox1</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Felis catus</i>	KF684894	<i>Cox1</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684905	<i>Cox1</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684904	<i>Cox1</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP229384	<i>Cox1</i>	513
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP229385	<i>Cox1</i>	513
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Felis catus</i>	KF684891	<i>Cox1</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684194	<i>Cox1</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684205	<i>Cox1</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684204	<i>Cox1</i>	601

<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP687810	<i>Coxl</i>	561
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP687811	<i>Coxl</i>	532
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684866	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684877	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684890	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684912	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684909	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684878	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684196	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis strongylus</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684876	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis strongylus</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684875	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis strongylus</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684872	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis strongylus</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684873	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides felis strongylus</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684874	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides orientis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684870	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides orientis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684869	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides orientis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684867	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides orientis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684868	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides orientis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KF684871	<i>Coxl</i>	601
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684208	<i>Coxl</i>	658
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684209	<i>Coxl</i>	658
<i>Ctenocephalides canis</i>	Pulicidae	<i>Canis lupus familiaris</i>	KP684210	<i>Coxl</i>	658
<i>Acanthopsylla jordani</i>	Pygiopsyllidae	<i>Antechinus flavipes</i>	JN008916	<i>Coxl</i>	652
<i>Pygiopsyllatunney</i>	Pygiopsyllidae	<i>Perameles bougainville</i>	JN008924	<i>Coxl</i>	651
<i>Pygiopsylla hilli</i>	Pygiopsyllidae	<i>Bettongia penicillata</i>	JN008915	<i>Coxl</i>	652
<i>Stephanocircus pectinipes</i>	Stephanocircidae	<i>Rattus fuscipes</i>	JN008923	<i>Coxl</i>	654
<i>Stephanocircus dasyuri</i>	Stephanocircidae	<i>Rattus fuscipes</i>	JN008920	<i>Coxl</i>	667
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Apodemus sylvaticus</i>	KF479241	<i>Coxl</i>	658
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Apodemus sylvaticus</i>	KF479242	<i>Coxl</i>	658
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Apodemus sylvaticus</i>	KF479243	<i>Coxl</i>	658
<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Stenoponiidae	<i>Apodemus sylvaticus</i>	KF479244	<i>Coxl</i>	658
<i>Stenoponia americana</i>	Stenoponiidae	Desconocido	KM891021	<i>Coxl</i>	1.251
<i>Neopsylla paranoma</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eospalax baileyi</i>	KJ471028	<i>Coxl</i>	1.532
<i>Neopsylla paranoma</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eospalax baileyi</i>	KJ471025	<i>Coxl</i>	1.532
<i>Neopsylla paranoma</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eospalax baileyi</i>	KJ471026	<i>Coxl</i>	1.532
<i>Paraceras melis melis</i>	Ctenophthalmidae	<i>Meles meles</i>	KF479245	<i>Coxl</i>	658
<i>Neopsylla sellaris</i>	Ctenophthalmidae	<i>Eospalax baileyi</i>	KJ471029	<i>Coxl</i>	1.532
<i>Corrodopsylla curvata curvata</i>	Ctenophthalmidae	Unkonwn	KM529504	<i>Coxl</i>	615
<i>Odontopsyllus quirosi quirosi</i>	Ceratophyllidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KF479240	<i>Coxl</i>	658
<i>Jellisonia amadoi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KF322091	<i>Coxl</i>	1.532
<i>Paraceras melis melis</i>	Ceratophyllidae	<i>Meles meles</i>	KF479245	<i>Coxl</i>	658
<i>Ceratophyllus hirundinis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890962	<i>Coxl</i>	1.227
<i>Ceratophyllus rusticus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890964	<i>Coxl</i>	1.212
<i>Ceratophyllus idius</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890963	<i>Coxl</i>	1.227
<i>Megabothris abantis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891009	<i>Coxl</i>	1.251
<i>Orchopeas agilis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM891014	<i>Coxl</i>	672
<i>Citellophilus tesquorum mongolicus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890971	<i>Coxl</i>	1.251
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890985	<i>Coxl</i>	1.224
<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890987	<i>Coxl</i>	1.218
<i>Ischnopsyllus indicus</i>	Ishnopsyllidae	Desconocido	KM890989	<i>Coxl</i>	1.251
<i>Peromyscopsylla silvatica</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	KM891006	<i>Coxl</i>	672
<i>Ophthalmopsylla kiritschenkoi</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	KM890974	<i>Coxl</i>	1.113
<i>Stephanocircus dasyuri</i>	Stephanocircidae	Mamífero	JN008920	<i>Coxl</i>	667
<i>Stephanocircus pectinipes</i>	Stephanocircidae	Mamífero	JN008923	<i>Coxl</i>	654
<i>Boreus elegans</i>	Boreidae	-	HQ696579	<i>Coxl</i>	16.803
<i>Microchorista philpotti</i>	Nannochoristidae	-	HQ696580	<i>Coxl</i>	19.092
<i>Anopheles farauti</i>	Culicidae	-	KF202472	<i>Coxl</i>	527
<i>Anopheles arabiensis</i>	Culicidae	-	DQ465294	<i>Coxl</i>	1.115
<i>Ophthalmopsylla praefecta praefecta</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	KM890714	<i>Cytb</i>	369
<i>Stenoponia tripectinata medialis</i>	Stenoponiidae	<i>Gerbillus dasyurus</i>	KM890602	<i>Cytb</i>	369
<i>Rhadinopsylla heiseri</i>	Ctenophthalmidae	<i>Ammospermophilus leucurus</i>	KM890594	<i>Cytb</i>	360
<i>Rhadinopsylla dahurica dahurica</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	KM890715	<i>Cytb</i>	369
<i>Rhadinopsylla dahurica vicina</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	KM890648	<i>Cytb</i>	366
<i>Ctenophthalmus sp.</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	KM890749	<i>Cytb</i>	369
<i>Ctenophthalmus sp.</i>	Ctenophthalmidae	Desconocido	KM890745	<i>Cytb</i>	369
<i>Myodopsylla trisellii</i>	Ishnopsyllidae	<i>Myotis lucifugus</i>	KM890661	<i>Cytb</i>	369
<i>Ischnopsyllus indicus</i>	Ishnopsyllidae	Desconocido	KM890724	<i>Cytb</i>	369
<i>Ischnopsyllus variabilis</i>	Ishnopsyllidae	Desconocido	KM890694	<i>Cytb</i>	369
<i>Ctenocephalides felis damarensis</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890641	<i>Cytb</i>	369
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890759	<i>Cytb</i>	369

<i>Archaeopsylla erinacei erinacei</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890725	Cytb	369
<i>Synopsyllus girardi</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890686	Cytb	369
<i>Xenopsylla conformis conformis</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890723	Cytb	369
<i>Xenopsylla skirabini</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890718	Cytb	369
<i>Xenopsylla ramesis</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890637	Cytb	342
<i>Echidnophaga oschanini</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890719	Cytb	369
<i>Spilopsyllus cuciculi</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890622	Cytb	369
<i>Cediopsylla inaequalis inaequalis</i>	Pulicidae	Desconocido	KM890600	Cytb	369
<i>Nosopsyllus iranisi theodori</i>	Ceratophyllidae	<i>Gerbillus dasyurus</i>	KM890603	Cytb	369
<i>Nosopsyllus laeviceps ellobii</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890720	Cytb	369
<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890722	Cytb	336
<i>Oropsylla hirsuta</i>	Ceratophyllidae	<i>Spermophilus variegatus</i>	KM890741	Cytb	366
<i>Thrassipandora pandorae</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890664	Cytb	369
<i>Foxella ignota</i>	Ceratophyllidae	<i>Geomys bursarius</i>	KM890593	Cytb	369
<i>Jellisonia amadoi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890755	Cytb	312
<i>Megabothris groenlandicus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890659	Cytb	369
<i>Ceratophyllus ciliates kincaidi</i>	Ceratophyllidae	<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	KM890592	Cytb	369
<i>Ceratophyllus zhovtyi</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890653	Cytb	363
<i>Ceratophyllus hirusdinis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890697	Cytb	363
<i>Ceratophyllus rusticus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890699	Cytb	333
<i>Ceratophyllus idius</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890698	Cytb	306
<i>Citellophilus tesquorum mongolicus</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890706	Cytb	306
<i>Orchopeas agilis</i>	Ceratophyllidae	<i>Neotoma lepida</i>	KM890591	Cytb	369
<i>Megabothris abantis</i>	Ceratophyllidae	Desconocido	KM890746	Cytb	369
<i>Peromyscopsylla selenis</i>	Leptopsyllidae	<i>Peromyscus maniculatus</i>	KM890601	Cytb	360
<i>Peromyscopsylla himalaica</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	KM890645	Cytb	369
<i>Peromyscopsylla silvatica</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	KM890743	Cytb	369
<i>Ophthalmopsylla kiritschenkoi</i>	Leptopsyllidae	Desconocido	KM890727	Cytb	306
RICKETTSIALES, RHIZOBIALES					
Especie	Familia	Fuente de aislamiento	Número de acceso	Gen o región	Longitud de la secuencia (pb)
<i>Brucella abortus</i>	Desconocido	Desconocido	X95889	ITS	765
<i>Brucella suis</i>	Desconocido	Desconocido	X95891	ITS	765
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Pulga aislada de <i>Meriones tristami</i>	GU354277	ITS	548
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Pulga aislada de <i>Meriones tristami</i>	GU354278	ITS	547
<i>Bartonella clarridgeiae</i>	Brasil	Sangre de gato	KC331014	ITS	592
<i>Bartonella clarridgeiae</i>	Portugal	Sangre de gato	AB896695	ITS	525
<i>Bartonella</i> sp.	Australia	Pulga aislada de <i>Vulpes vulpes</i> (Zorro rojo)	HM990962	ITS	957
<i>Candidatus Bartonella eldjazairii</i>	Algeria	Pulga aislada de roedor	EU263641	ITS	646
<i>Bartonella rochalimae</i>	Estados Unidos	Sangre de perro	DQ676491	ITS	593
<i>Bartonella rochalimae</i>	Perú	Sangre de humano	DQ683199	ITS	626
<i>Bartonella</i> sp.	España	<i>Pulex irritans</i> aislado de <i>Vulpes vulpes</i> (red fox)	EU191619	ITS	714
<i>Bartonella</i> sp.	Egipto	<i>Xenopsylla cheopis</i>	DQ166943	ITS	624
<i>Bartonella</i> sp.	Australia	<i>Ctenocephalides felis</i> aislado de <i>Vulpes vulpes</i> (Zorro rojo)	HM990957	ITS	862
<i>Bartonella henselae</i>	Guatemala	Sangre de gato	KP822820	ITS	595
<i>Bartonella</i> sp.	Portugal	<i>Ornithophaga</i> sp. aislado de <i>Mus spretus</i>	AY877425	ITS	576
<i>Bartonella</i> sp.	Portugal	<i>Stenoponia tripectinata</i> aislado de <i>Mus spretus</i>	AY877424	ITS	576
<i>Bartonella elizabethae</i>	Estados Unidos	Tejido cardíaco de <i>Meriones lybicus</i>	JF766264	ITS	561
<i>Bartonella elizabethae</i>	Estados Unidos	Tejido cardíaco de <i>Apodemus sylvaticus</i>	JF766266	ITS	560
<i>Bartonella</i> sp.	España	Mouse spleen obtained from <i>Mus spretus</i>	EU218552	ITS	809
<i>Bartonella</i> sp.	Estados Unidos	Tejido cardíaco de <i>Apodemus sylvaticus</i>	JN403036	ITS	560
<i>Bartonella elizabethae</i>	Desconocido	Desconocido	L35103	ITS	1.612
<i>Bartonella tribocorum</i>	Estados Unidos	<i>Xenopsylla cheopis</i>	DQ480757	ITS	740
<i>Bartonella grahamii</i>	Corea del Sur	Tejido de bazo de <i>Apodemus agrarius</i>	JN810837	ITS	490
<i>Bartonella grahamii</i>	Corea del Sur	Tejido de bazo de <i>Apodemus agrarius</i>	JN810841	ITS	490
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Pulga aislada de roedor mürido	GU937230	ITS	495
<i>Bartonella</i> sp.	Israel	Pulga aislada de roedor mürido	GU354273	ITS	496
<i>Rickettsia</i> sp.	Desconocido	<i>Otiorynchus sulcatus</i>	JN394468	16S	759

<i>Rickettsia</i> sp.	Desconocido	<i>Deronectes platynotus</i>	FM177870	16S	1.418
<i>Wolbachia pipientis</i>	Túnez	<i>Phlebotomus</i> sp.	EU780684	16S	861
<i>Wolbachia</i> sp.	Japón	<i>Cerculio</i> sp.	AB746405	16S	1.416
Candidatus <i>Wolbachia brouquii</i>	Francia	<i>Sergentomyia</i> sp.	DQ402520	16S	1.390
<i>Wolbachia</i> sp.	Desconocido	<i>Exorista sorbillans</i>	EF392723	16S	835
Candidatus <i>Wolbachia inokumae</i>	Francia	<i>Phlebotomus</i> sp.	DQ402518	16S	1.423
<i>Wolbachia pipientis</i>	Desconocido	<i>Culex pipiens</i>	U23709	16S	1.593
<i>Wolbachia</i> sp.	Argentina	<i>Naupactus cervinus</i>	GQ402143	16S	805
<i>Wolbachia</i> sp.	Brasil	<i>Diaphorina citri</i>	EU914940	16S	1.063
<i>Wolbachia</i> sp.	España	<i>Philaenus maghresignus</i>	AB772263	16S	1.426
<i>Wolbachia</i> sp.	Estados Unidos	<i>Pulex irritans</i> aislado de <i>Cynomys</i> sp.	AY335926	16S	1.306
<i>Wolbachia</i> sp.	Estados Unidos	<i>Oropsylla hirsuta</i> aislado de <i>Cynomys</i> sp.	AY335925	16S	1.305
<i>Wolbachia pipientis</i>	China	<i>Stomaphis</i> sp.	KF751211	16S	1.272
<i>Wolbachia</i> sp.	Japón	<i>Penicillidia jenynsii</i>	AB632591	16S	1.426
<i>Wolbachia</i> sp.	República Checa	<i>Ogcodes fumatus</i>	HE575187	16S	853
<i>Wolbachia</i> sp.	Japón	<i>Kleidocerys resedae</i>	JQ726771	16S	1.427
<i>Wolbachia pipientis</i>	Bélgica	<i>Lycoriella</i> sp.	AY026912	16S	1.458
<i>Wolbachia pipientis</i>	Eslovaquia	<i>Drosophila</i> sp.	GU724968	16S	903
<i>Wolbachia pipientis</i>	Francia	<i>Ixodes ricinus</i>	AY833061	16S	1.497
<i>Wolbachia</i> sp.	Brasil	<i>Xenopsylla cheopis</i> aislado de <i>Rattus</i> sp.	AY335935	16S	1.307
<i>Wolbachia</i> sp.	Argentina	<i>Phtiropsylla agenoris</i> aislado de <i>Zaedyus pichyi</i>	AY335932	16S	1.306
<i>Wolbachia</i> sp.	Brasil	<i>Adoratopsylla intermedia</i> aislado de <i>Metachirus</i> sp.	AY335929	16S	1.306
<i>Wolbachia</i> sp.	Brasil	<i>Polygenis pradoi</i> aislado de <i>Akodon</i> sp.	AY335930	16S	1.306
<i>Wolbachia</i> sp.	Brasil	<i>Xenopsylla cheopis</i> aislado de <i>Rattus</i> sp.	AY335936	16S	1.306
<i>Wolbachia</i> sp.	Perú	<i>Ctenocephalides felis</i> aislado de <i>Canis lupus familiaris</i>	AY335923	16S	1.303
<i>Wolbachia</i> sp.	Estados Unidos	<i>Geusibia ashcrafti</i> aislado de <i>Ochotona</i> sp.	AY335921	16S	1.308
<i>Wolbachia</i> sp.	México	<i>Echidnophaga gallinacea</i> aislado de <i>Urocyon</i> sp.	AY335919	16S	1.305
<i>Wolbachia</i> sp.	Estados Unidos	<i>Peromyscopsylla selensis</i> aislado de <i>Peromyscus</i> sp.	AY335928	16S	1.308
<i>Wolbachia</i> sp.	Chile	<i>Sphinctopsylla ares</i> aislado de <i>Oryzomys</i> sp.	AY335920	16S	1.305
<i>Wolbachia</i> sp.	México	<i>Jellisonia</i> sp. aislado de <i>Oryzomys</i> sp.	AY335922	16S	1.307
<i>Wolbachia</i> sp.	Honduras	<i>Jellisonia</i> sp. aislado de roedor mürido	AY335917	16S	1.306
<i>Wolbachia</i> sp.	Estados Unidos	<i>Myodopsylla gentilis</i> aislado de <i>Myotis</i> sp.	AY335918	16S	1.307
<i>Wolbachia</i> sp.	Perú	<i>Pulex simulans</i> aislado de <i>Cavia aperea</i>	AY335934	16S	1.304
<i>Wolbachia</i> sp.	Venezuela	<i>Craneopsylla minerva</i> aislado de <i>Rhipidomys</i> sp.	AY335927	16S	1.305
<i>Wolbachia</i> sp.	Perú	<i>Ectinorus</i> sp. aislado de <i>Lagidium</i> sp.	AY335931	16S	1.306
<i>Wolbachia</i> sp.	Perú	<i>Plocopsylla achillea</i> aislado de <i>Akodon</i> sp.	AY335933	16S	1.307

Los métodos de reconstrucción filogenética pueden dividirse en dos categorías en base al tipo de datos que emplean (caracteres discretos o distancias). En la presente Tesis Doctoral se utilizaron ambos tipos de métodos. Además, para realizar los análisis filogenéticos, se utilizaron tanto las secuencias obtenidas por nosotros mismos (Tablas 3

y 4), así como un número variable de secuencias depositadas por otros autores en GenBank (Tabla 7).

Los métodos de distancia convierten los alineamientos de secuencias en una matriz de distancias genéticas en base al modelo evolutivo seleccionado, la cual es usada por el método algorítmico de reconstrucción para calcular el árbol. Estos métodos poseen la ventaja de que son muy rápidos. Se basan en el reagrupamiento de las poblaciones a partir de sus distancias genéticas. Para este tipo de análisis se ha utilizado el método del “vecino más próximo” (*Neighbor-Joining*) (Saitou y Nei, 1987).

Método de *Neighbor-Joining* (NJ)

Este método agrupa a las dos unidades taxonómicas operacionales (OTUs) más próximas y luego adiciona progresivamente los otros taxones alejados. Sin embargo, en cada paso del análisis, nuevas matrices de distancias se van originando a partir de la matriz original, de manera que la divergencia entre cada par de OTUs es ajustada basándose en la divergencia promedio de ellas con respecto al resto de los taxones. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa *MEGA* versión 5.2 (Tamura y col., 2011).

Por otra parte, los métodos basados en caracteres consideran cada sitio del alineamiento (o una función probabilística para cada sitio) directamente. A diferencia de los métodos de distancias tienen dos pasos lógicos:

1. Definir el criterio de optimización (descrito formalmente en una función objetiva) para evaluar cada posible topología, asignándole una puntuación con la que poder comparar cuantitativamente el mérito de cada árbol en base al criterio de optimización.

2. En un segundo paso se usan algoritmos de búsqueda específicos para calcular el valor de la función de objetividad y para encontrar el/los árbol(es) con la mejor puntuación acorde a este criterio (un valor máximo o mínimo, según el caso).

Estos métodos son muchísimo más lentos que los algorítmicos, debido a que tienen que hacer búsquedas en el inmenso espacio de topologías para encontrar la(s) mejor(es). Se trata de métodos puramente algorítmicos, representando una buena aproximación heurística para encontrar el árbol de evolución mínima más corto. En la presente Tesis Doctoral se han utilizado 3 métodos diferentes basados en caracteres:

Método de Máxima Parsimonia (MP)

Parsimonia es el principio de lógica por el cual una explicación simple debería preferirse a otra explicación más compleja. En el contexto de una inferencia evolutiva, el árbol más parsimonioso es aquél que requiere los menores cambios evolutivos para explicar las diferencias entre los taxones (Hillis y Bull, 1993). Se pueden obtener más de un árbol parsimonioso, de diferente topología pero igualmente parsimoniosos.

Este método utiliza sólo posiciones filogenéticamente informativas para construir los árboles. Un sitio es informativo cuando hay, al menos, dos clases de nucleótidos en una posición determinada de las secuencias analizadas (Li y Graur, 1991). El método de MP permite utilizar como un quinto sitio informativo (quinto carácter) las inserciones o supresiones. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa MEGA versión 5.2 (Tamura y col., 2011).

Método de Máxima verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*)

Este método probabilístico evalúa una hipótesis filogenética en términos de la probabilidad de que un determinado modelo evolutivo propuesto haya dado lugar o

explique los datos observados (secuencias de nucleótidos) (Huelsenbeck y Crandall, 1997). Concretamente, se basa en el uso de una cantidad llamada *log-likelihood*, en base a la cual se evalúan las topologías alternativas. Se trata de encontrar aquella que maximiza este valor. El *log-likelihood* es el logaritmo neperiano (ln) de la verosimilitud, que es igual a la probabilidad de los datos observados dada una topología particular, un conjunto de longitudes de rama y un modelo de sustitución determinados. Por tanto, la filogenética bajo este método se puede considerar como un problema de selección de modelos. Trata de encontrar las estimaciones de los valores de cada parámetro del modelo y luego comparar las verosimilitudes de los distintos modelos, escogiendo la mejor topología en base a su verosimilitud. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa *PHYML package* (Guindon y Gascuel, 2003).

Inferencia Bayesiana

La Inferencia Bayesiana (IB) se basa en la relación cuantitativa existente entre la función de verosimilitud y las distribuciones anteriores y posteriores de probabilidad. Esta relación viene dada por el teorema de Bayes (Teorema de Bayes generalizado por Laplace en 1763), el cual permite calcular la probabilidad posterior a partir de la verosimilitud y probabilidad anterior de los datos; está basada en la definición de probabilidades conjuntas. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron los programas MrBayes versiones 3.1.2 y 3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

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. Este método se basa en el remuestreo de la propia muestra partiendo de la idea de que la distribución del parámetro verdadero puede ser estimada

por la generación de repeticiones y análisis de datos artificiales. Generalmente, este proceso se repite un gran número de veces (generalmente 100 o 1000), creando muchos nuevos conjuntos de datos. En el caso de los árboles obtenidos mediante IB, el soporte estadístico obtenido fue expresado en forma de probabilidades bayesianas transformadas en porcentajes. Además se utilizó el programa *TRACER* versión 1.6 (Rambaut y Drummond, 2007) para evaluar la idoneidad del muestreo repetitivo y el grado de convergencia del mismo.

Por último, se obtuvieron los haplotipos correspondientes de las diferentes matrices de datos utilizando el programa *DnaSP* versión 5.0 (Librado y Rozas, 2009), mientras que, para la construcción de la red de estos haplotipos se utilizó el programa *NETWORK* versión 5.0.0.0 (Bandelt y col., 1999; disponible en www.fluxus-engineering.com). Se utilizó el método de Median-Joining (Bandelt y col., 1999) para visualizar las relaciones evolutivas entre dichos haplotipos.

A.I.2.3. Análisis basados en la técnica MALDI-TOF MS

Para los estudios de MALDI-TOF MS llevados a cabo en las distintas muestras de sifonápteros estudiadas en la presente Tesis Doctoral se utilizaron los tres pares de patas y el cefalotórax de especímenes previamente preservados en alcohol de 70° y 96°. Dichas partes fueron colocadas posteriormente en un Eppendorf de 1,5 ml e incubadas a 37° C durante toda la noche para eliminar todo el alcohol residual (Diarra y col., 2017). Después de este paso, a cada Eppendorf se le añadió una bola de tungsteno (Qiagen, Hilden, Alemania) y 20 µl de una mezcla al 50 % de ácido fórmico al 70 % (v/v) y acetonitrilo al 50 % (v/v). Posteriormente, cada muestra fue homogeneizada utilizando el aparato *TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Alemania) durante 3 ciclos de 30 segundos cada uno a una frecuencia de 30Hz. Cada muestra homogeneizada fue seguidamente

centrifugada a 10000 r.p.m. durante 30 segundos para después depositar 1 μ l de sobrenadante en la placa de MALDI-TOF (Nebbak y col., 2017). Se cargaron en total 4 pocillos de la placa por muestra. Cada gota de sobrenadante fue recubierta posteriormente con 1 μ l de matriz CHCA (Solución saturada de ácido α -cyano-4-hidroxicinámico, acetonitrilo al 50 % [v/v], ácido trifluoroacético al 2,5 % [v/v] y agua para cromatografía HPLC) (Yssouf y col., 2016). La placa de MALDI-TOF se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos aproximadamente para luego ser introducida en el espectrómetro *Microflex LT MALDI-TOF* (Bruker Daltonics, Alemania) donde se realizó el análisis utilizando los parámetros previamente descritos por Nebbak y col. (2017). Por cada placa se utilizó un espécimen fresco de *C. felis* como control positivo además de 2 μ l de solución matriz CHCA como control negativo. Los espectros obtenidos fueron visualizados utilizando el programa *Flex analysis v.3.3* y exportados posteriormente a los programas *ClinProTools v.2.2* y *MALDI-Biotyper v.3.0* (Bruker Daltonics, Alemania) para el procesado y análisis de los resultados obtenidos. Sólo los espectros de alta calidad y reproducibles fueron cargados en la base de datos utilizando el programa *MALDI-Biotyper v.3.0*. Para cada especie se cargaron entre tres y cinco espectros de referencia en la base de datos. Con el fin de confirmar la reproducibilidad de los espectros añadidos a la base de datos, se realizó un test ciego para cada una de las especies añadidas. Debido a que se cargaron 4 pocillos de la placa por cada muestra estudiada, se obtuvieron 4 espectros diferentes por cada muestra. Los resultados del test ciego fueron representados en valores logarítmicos (LSV) que oscilaron entre 0-3 en función del grado de similitud entre el espectro evaluado y el espectro de referencia depositado previamente en la base de datos. La identificación del test ciego fue considerada óptima cuando se obtuvo una identificación correcta a nivel de especie con valores logarítmicos superiores a 1,9.

Por otro lado se realizó un dendrograma mediante el programa *MALDI Biotyper v.3.0*, utilizando al menos 8 espectros por cada especie estudiada y basándonos en los resultados de nuestra matriz *CCI (Composite Correlation Index)*. Estas matrices se calculan dividiendo cada espectro en intervalos y comparando posteriormente estos intervalos a lo largo de todo el conjunto de datos. La composición y correlación de estos intervalos fueron usados como parámetros para definir la distancia existente entre cada espectro. Un valor de 1 asociado a nuestra matriz *CCI* representa una correlación completa, mientras que un valor de *CCI* igual a 0 representa una ausencia total de correlación (Laorche y col., 2017). Por último, para comparar los espectros de aquellos sifonápteros infectados y no infectados por alguna especie patógena se utilizó el programa *ClinProTools v.2.2* (Bruker Daltonics, Alemania) con el fin de identificar una serie de picos espectrales discriminativos entre ambos grupos. Para ello, se generó un espectro promedio para cada grupo (infectado y no infectado) y para cada especie patógena. Los parámetros seleccionados en el programa *ClinProTools v.2.2* para llevar a cabo este análisis comparativo fueron los descritos por Yssouf y col. (2013). Además, se realizó un Análisis de los Principales Componentes (PCA) con el fin de comparar visualmente los espectros de ambos grupos.

A.I.2.4. Detección de patógenos en las especies de sifonápteros estudiadas mediante técnicas moleculares

Para llevar a cabo la detección de bacterias patógenas en las muestras de sifonápteros estudiadas se utilizaron dos tipos de técnicas moleculares: PCR estándar y PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). La qPCR se diferencia de la PCR estándar en que permite monitorizar en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos. Cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, por lo que ésta es proporcional a la cantidad de ADN

generado. Además, el sistema de PCR a tiempo real proporciona mayor sensibilidad y robustez, con la posibilidad añadida de cuantificar la cantidad inicial de ADN diana presente en la muestra. El resultado de una PCR a tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador (umbral de detección), una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, el cual es en forma exponencial en su inicio, y una tercera fase donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

El material de partida utilizado para la extracción de ADN fue el abdomen de cada espécimen. La técnica de extracción de ADN fue la misma que la utilizada para llevar a cabo los estudios filogenéticos. Las reacciones de qPCR se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante descrito para el sistema de detección de PCR CFX Connect™ Real-Time (Bio-Rad) utilizando los reactivos del kit *Light Cycler 480 Probes Master Mix* (Roche Diagnostics, Meylan, Francia). En todos los casos la mezcla de reacción de qPCR contuvo 10 µl de *Takyon Master Mix* (Takyon, Eurogentec, Bélgica), 3 µl de agua destilada, 0,5 µl de cada cebador, 0,5 µl of *Uracil-ADN-glicosilasa (UDG)*, 0,5 µl de sonda y 5 µl of de ADN diana. Las referencias de los cebadores, sondas y regiones de ADN elegidas para cada patógeno estudiado están resumidas en la tabla 8. En algunos de estos patógenos como por ejemplo *C. burnetii* se utilizó más de un gen diana con el fin de evitar falsos positivos. Para todos los ensayos de qPCR realizados, sólo se consideraron positivos aquéllos que presentaron un Ct (ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral de detección) menor de 35. Como controles positivos se utilizaron cepas de laboratorio pertenecientes a las especies

Rickettsia montanensis, *R. felis*, *R.typhi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *W. pipientis*, *Borrelia crocidurae*, *B. quintana*, *B. henselae*, *C. burnetii* y *M. ulcerans*. Para los casos en los que los patógenos no pudieron ser identificados a nivel de especie se realizó una PCR estándar con el fin de amplificar y secuenciar una región de ADN determinada. Todas estas regiones diana y referencias de los marcadores utilizados están descritos en la tabla 8. El protocolo de ciclos y la mezcla de PCR utilizada fueron las descritas por Diarra y col. (2017).

Tabla 8. Gen diana y referencias de cebadores y sondas utilizadas para la detección molecular de los distintos patógenos estudiados en la presente Tesis Doctoral.

qPCR		
Microorganismo	Gen o región diana	Referencia de Cebadores y Sonda
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>GltA</i>	Rolain y col. (2002)
<i>R. felis</i>	<i>Gen de la fosfatasa</i>	Dieme y col. (2015)
<i>R. typhi</i>	Proteína hipotética	Luce-Fedrow y col. (2015)
<i>Bartonella</i> spp.	ITS2	Rolain y col. (2003)
<i>B. henselae</i>	<i>Pap31</i>	Angelakis y col. (2009)
<i>B. quintana</i>	<i>YopP</i>	Angelakis y col. (2011)
<i>Borrelia</i> spp.	ITS4	Mediannikov y col. (2010)
	16S	Rolain y col. (2005)
Anaplasmataceae spp.	23S	Djiba y col. (2013)
<i>Wolbachia</i> sp.	23S	Rolain y col. (2003)
<i>C. burnetii</i>	IS30A	Rolain y col. (2005)
	IS1111A	Willems y col. (1994)
<i>Mycobacterium</i> spp.	ITS	Bruijnesteijn Van Coppenraet y col. (2004)
PCR estándar		
<i>Bartonella</i> spp.	<i>GltA</i>	La Scola y col. (2003)
	ITS (16S-23S)	Rolain y col. (2003)
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>RpoB</i>	Adékambi y col. (2003)
<i>Wolbachia</i> sp.	16S	Rolain y col. (2003)

A.I.3. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, R. y Morrone, J.J. (2013) Phylogenetics of the tribe Phalacroscyllini (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Neopsyllinae) based on molecular and morphological evidence. *Zootaxa*, 3630: 333–346.

Adékambi, T., Colson, P. y Drancourt, M. (2003) RpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5699–5708.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.

Angelakis, E., Roux, V., Raoult, D. y Rolain, J.M. (2009) Real-time PCR strategy and detection of bacterial agents of lymphadenitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28: 1363–1368.

Angelakis, E., Rolain, J.M., Raoult, D. y Brouqui, P. (2011) *Bartonella quintana* in head louse nits. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62: 244–246.

Bandelt, H.J., Forster, P. y Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48.

Barrera, A. (1955) Las especies Mexicanas del género *Pulex* Linnaeus (Siph, Pulicidae). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 8: 219–236.

Beaucournu, J.C. y Launay, H. (1990) Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental, Faune de France, Vol. 76. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris.

Beaucournu, J.C. y Ménier, K. (1998) Le genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasite*, 5: 3–16.

Bruijnesteijn Van Coppentraet, E.S., Lindeboom, J.A., Prins, J.M., Peeters, M.F., Claas, E.C. y Kuijper, E.J. (2004) Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2644–2650.

Cerdán, M.E., Freire, M.A., González, M.I. y Rodríguez, A.M. (1997) Biología molecular: avances y técnicas generales. Universidade da Coruña.

- Cutillas, C., Callejón, R., de Rojas, M., Tewes, B., Ubeda, J.M., Ariza, C. y Guevara, D.C. (2009) *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica*, 111: 299–307.
- Diarra, A.Z., Almeras, L., Laroche, M., Berenger, J.M., Koné, A.K., Bocoum, Z., Dabo, A., Doumbo, O., Raoult, D. y Parola, P. (2017) Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria in Mali. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11: e0005762.
- Dieme, C., Bechah, Y., Socolovschi, C., Audoly, G., Berenger, J.M., Faye, O., Raoult, D. y Parola, P. (2015). Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 8088–8093.
- Dittmar, K. y Whiting, M.F. (2003) Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (*CytB* and *CoII*). *Journal of Parasitology Research*, 91: 55–59.
- Djiba, M.L., Mediannikov, O., Mbengue, M., Thiongane, Y., Molez, J.F., Seck, M.T., Fenollar, F., Raoult, D. y Ndiaye, M. (2013) Survey of Anaplasmataceae bacteria in sheep from Senegal. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 1557–1561.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–1797.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 3: 294–299.
- Gasser, R.B., Nansen, P. y Guldborg, P. (1996) Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Molecular Cellular Probes*, 10: 99–105.
- Giannetto, S., Virga, A. y Iori, A. (1997) New record of *Nosopsyllus* (*Nosopsyllus*) *barbarus* (Jordan and Rothschild, 1912) (Aphaniptera: Dolichopsyllidae) from Sicily.

Morphology at scanning electron microscopy of *N. (N.) barbarus* and *N. (N.) fasciatus* (Bosc D'Antic, 1800). *Parassitologia*, 39: 29–32.

Gil Collado, J. (1949) Pulgas españolas parásitas de roedores. *Revista Ibérica de Parasitología*, 9: 214–258.

Gil Collado, J. (1960) Insectos y ácaros de los animales domésticos. *Ediciones Salvat*, 20: 305–325.

Guindon, S. y Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696–704.

Hastriter, M.W. y Tipton, V.J. (1975) Fleas (Siphonaptera) associated with small mammals of Morocco. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*, 50: 79–169.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. y De Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270: 313–321.

Hillis, D.M. y Bull, J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, 42: 182–192.

Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1953) An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History), Tungidae and Pulicidae, Vol. 1. Trustees of the British Museum (Natural History), London.

Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1962) An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History). Vol. 3. Hystrichopsyllidae, Trustees of the British Museum (Natural History), London.

Huelsenbeck, J.P. y Crandall, K.A. (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 28: 437–466.

Huelsenbeck, J.P. y Rannala, B. (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, 276: 227–232.

- Jordan, K. y Rothschild, N.C. (1912) On Siphonaptera collected in Algeria. *Novitates Zoologicae*, 19: 357–372.
- Jordan, K. (1958) A contribution to the taxonomy of *Stenoponia* J. y R. (1911), a genus of Palaearctic and Nearctic fleas. *British Museum (Natural History)*, 6: 169–202.
- Kaewmongkol, G., Kaewmongkol, S., McInnes, L.M. Burmej, H., Bennet, M.D., Adams, P.J., Ryan, U., Irwin, P.J. y Fenwick, S.G. (2011) Genetic characterization of flea derived *Bartonella* species from native animals in Australia suggest host-parasite co-evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 1868–1872.
- La Scola, B., Zeaiter, Z., Khamis, A. y Raoult, D. (2003) Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. *Trends in Microbiology*, 11: 318–321.
- Larkin, M.A., Blackshields, G. y Brown, N.P. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947–2948.
- Laroche, M., Bérenger, J.M., Gazelle, G., Blanchet, D., Raoult, D. y Parola, P. (2017) MALDI-TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana. *Parasitology*, doi: 10.1017/S0031182017001743.
- Lewis, R.E. (1967) Contributions to a taxonomic revision of the genus *Nosopsyllus* Jordan, 1933. *Journal of Medical Entomology*, 4: 123–142.
- Lewis, R.E. (1993) Notes on the geographical distribution and host preferences in the Order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Journal of Medical Entomology*, 30: 239–256.
- Li, W.H. y Graur, D. (1991). Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 284.
- Librado, P. y Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Luce-Fedrow, A., Mullins, K., Kostik, A.P., St John, H.K., Jiang, J. y Richards, A.L. (2015) Strategies for detecting rickettsiae and diagnosing rickettsial diseases. *Future Microbiology*, 10: 537–564.

- Luchetti, A., Trentini, M., Pampiglone, S., Fiorawanti, M.L. y Mantovani, B. (2007) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) and fleas across South America and Africa. *Parasitology Research*, 100: 593–598.
- Marrugal, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A. y Cutillas, C. (2013) Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research*, 112: 2289–2298.
- Mediannikov, O., Trape, J.F., Diatta, G., Parola, P., Fournier, P.E. y Raoult D. (2010) *Rickettsia africae*, Western Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 571–573.
- Ménier, K. y Beaucournu, J.C. (1998) Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles y Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. *Journal of Medical Entomology*, 35: 883–890.
- Nebbak, A., El Hamzaoui, B., Berenger, J.M., Bitam, I., Raoult, D., Almeras, L. y Parola, P. (2017) Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. *Medical Veterinary Entomology*, 31: 438–448.
- Pardo, A. y Ruiz, M.A. (2002) SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Madrid, McGraw-Hill.
- Posada, D. y Buckley, T.R. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53: 793–808.
- Posada, D. (2008) Jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- Promega (1997). Technical manual T; 042. *pGEM®-T Easy Vector Systems*.
- Rambaut, A. y Drummond, A. (2007) Tracer v1.6. Available online at <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Rice, P., Longden, I. y Bleasby, A. (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16: 276–277.

- Rolain, J.M., Stuhl, L., Maurin, M. y Raoult, D. (2002) Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2747–2751.
- Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B. y Raoult, D. (2003) Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 338–342.
- Rolain, J.M. y Raoult, D. (2005) Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. *QJM*, 98: 615–617.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- Saitou, N. y Nei, N. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2^oed, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning*, 3^a ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smit, F.G.A.M. (1958) A preliminary note on the occurrence of *Pulex irritans* and *Pulex simulans* baker in North America. *The Journal of Parasitology*, 44: 523–526.
- Stothard, P. (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28: 1102–1104.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagburn, B.L., Bond, R., Denholm, I., Dryden, M.W., Payne, P., Rust, M.K., Schroeder, I., Vaughn, M.B. y Bledsoe, D. (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, 94: 219–226.

Willems, H., Thiele, D., Frölich-Ritter, R. y Krauss, H. (1994) Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zoonoses and Public Health*, 41: 580–587.

Yssouf, A., Socolovschi, C., Flaudrops, C., Ndiath, M.O., Sougoufara, S., Dehecq, J.S. Lacour, G., Berenger, J.M., Sokhna, C.S., Raoult, D. y Parola, P. (2013) Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. *PLoS One*, 8: e72380.

Yssouf, A., Almeras, L., Raoult, D. y Parola, P. (2016) Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiology* 11: 549–566.