



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**PULGAS DE PERROS RURALES DEL NORESTE DEL URUGUAY:  
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR**

**por**

Junior Ricardo GARCIA DA ROSA MARTINS  
Camilo Sebastian ALVEZ SILVA

TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: ensayo experimental

**CENUR Litoral Norte – SALTO  
URUGUAY**

**2023**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



---

Lic. Oscar Castro

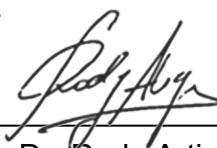
Segundo miembro:



---

Dr. José M. Venzal

Tercer miembro:



---

Dr. Rody Artigas

Cuarto miembro:



---

Dra. María L. Félix

Fecha:

23/06/2023

Autores:



Junior Ricardo Garcia da Rosa Martins



Camilo Sebastian Alvez Silva

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestras familias que son nuestros pilares y nos apoyaron incondicionalmente a lo largo de este camino para culminar esta carrera universitaria.

A los productores, propietarios y responsables de los perros que nos facilitaron el muestreo que hizo posible la realización de esta tesis. También al Guardaparques del Paisaje Protegido Valle del Lunarejo y su señora por la atención, así como al personal de la biblioteca de Facultad de Veterinaria por facilitarnos los artículos.

Al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas del CENUR Litoral Norte y a la Facultad de Veterinaria por permitirnos desarrollar la tesis de grado. Al Dr. José Manuel Venzal (Tutor) y la Dra. María Laura Félix (Co-Tutora) por brindarnos este tema de investigación, por la ayuda y por el gran apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
1.1. Las pulgas: origen e historia.....	10
1.2. Clasificación taxonómica de las pulgas.....	10
1.3. Morfología general de las pulgas .....	11
1.3.1. Larvas .....	11
1.3.2. Adultos .....	11
1.4. Biología de las pulgas .....	17
1.5. Importancia sanitaria de las pulgas para humanos y animales .....	19
1.5.1. Principales patógenos transmitidos.....	20
1.5.2. Como hospedadores intermediarios.....	22
1.5.3. Pulicosis alérgica, otras hipersensibilidades .....	23
1.6. Estudios moleculares en la clasificación y filogenia de las pulgas .....	23
1.7. Pulgas de importancia sanitaria en carnívoros y humanos en Uruguay .....	24
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Objetivo general .....	24
3.2. Objetivos específicos .....	24
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1. Obtención de las pulgas .....	24
4.1.1. Muestreos .....	24
4.1.2. Obtención de las muestras.....	25
4.1.3. Recolección de las pulgas.....	25
4.2. Clasificación morfológica de las pulgas.....	25
4.3. Amplificación del ADN y obtención de secuencias del gen cox1 (citocromo c oxidasa subunidad I) de pulgas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	26

4.3.1. Extracción de ADN.....	26
4.3.2. Amplificación del gen <i>cox1</i> de pulgas mediante PCR.....	26
4.3.3. Obtención de las secuencias y análisis filogenéticos.....	27
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>56</b>

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Larvas de <i>Ctenocephalides felis</i> .....	11
<b>Figura 2:</b> Fotografía de una hembra de <i>Ctenocephalides felis</i> con las divisiones del cuerpo .....	12
<b>Figura 3:</b> Diseño de la morfología detallada de una hembra de sifonáptero generalizado.....	13
<b>Figura 4:</b> Esquema de la cabeza de adulto de un sifonáptero generalizado.....	14
<b>Figura 5:</b> Genitalia de pulga macho.....	16
<b>Figura 6:</b> Segmento posterior de abdomen y espermateca de hembra de pulga.....	17
<b>Figura 7:</b> Esquema del ciclo biológico de <i>Ctenocephalides felis</i> .....	19
<b>Figura 8:</b> Muestreo en el departamento de Artigas.....	28
<b>Figura 9:</b> Muestreo en el departamento de Rivera.....	29
<b>Figura 10:</b> Muestreo en el departamento de Tacuarembó.....	30
<b>Figura 11:</b> Frecuencia de perros negativos e infectados con distintas especies de pulgas.....	32
<b>Figura 12:</b> Diferencias morfológicas entre los géneros <i>Ctenocephalides</i> y <i>Pulex</i> ... ..	32
<b>Figura 13:</b> Diferencias morfológicas de la cabeza de <i>Ctenocephalides felis</i> y <i>Ctenocephalides canis</i> .....	33
<b>Figura 14:</b> Diferencias morfológicas de la tibia del tercer par de patas de <i>Ctenocephalides felis</i> y <i>Ctenocephalides canis</i> .....	34
<b>Figura 15:</b> Gel de la corrida de electroforesis del protocolo Folmer et al. (1994), condiciones de Zurita et al. (2019) y Lawrence et al. (2015) .....	37
<b>Figura 16:</b> Gel de la corrida de electroforesis del protocolo de Lawrence et al. (2014), condiciones de Zurita et al. (2019) y Zhang et al. (2022). .....	38
<b>Figura 17:</b> Árbol filogenético construido con secuencias parciales del gen <i>cox-1</i> . ...	47

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Cebadores utilizados en el estudio.....	27
<b>Tabla 2.</b> Prevalencia de pulgas en perros de zonas rurales para los tres departamentos.....	30
<b>Tabla 3.</b> Intensidad y abundancia media de pulgas en perros de zonas rurales para los tres departamentos .....	31
<b>Tabla 4.</b> Especies, número y sexo de las pulgas halladas en perros para cada departamento .....	31
<b>Tabla 5.</b> Índices poblacionales de <i>C. felis</i> por departamento .....	35
<b>Tabla 6.</b> Índices poblacionales de <i>C. canis</i> por departamento .....	35
<b>Tabla 7.</b> Índices poblacionales de <i>P. irritans</i> por departamento .....	35
<b>Tabla 8.</b> Pulgas seleccionadas para la extracción de ADN y amplificación mediante PCR de un fragmento del gen <i>cox1</i> .....	35
<b>Tabla 9:</b> Pulgas procesadas mediante PCR para amplificar un fragmento del gen <i>cox1</i> y muestras enviadas a secuenciar.....	39
<b>Tabla 10:</b> Secuencias obtenidas y porcentaje de identidad .....	42

## RESUMEN

Las pulgas son insectos pertenecientes al orden Siphonaptera de las que se reconocen más de 2575 especies distribuidas en 15 o 18 familias según diferentes autores. Son ápteras con cuerpo aplanado lateralmente y con el tercer par de patas muy desarrollado y adaptado para el salto. Los adultos son parásitos hematófagos de animales de sangre caliente (mamíferos y aves) y las larvas poseen aparatobucal masticador y se alimentan de detritos. En cuanto al desarrollo, sumetamorfosis es holometábola, pasando por cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Desde el punto de vista sanitario son importantes vectores de enfermedades de interés médico y veterinario. El objetivo de este estudio fue identificar morfológicamente y molecularmente las especies de pulgas presentes en perros rurales del noreste del Uruguay. Para ello se examinaron 180 perros en los departamentos de Artigas, Rivera y Tacuarembó y las pulgas obtenidas fueron clasificadas morfológicamente a nivel específico mediante el uso de claves taxonómicas. Además, se calcularon los siguientes índices poblacionales: prevalencia, intensidad y abundancia media. Para cada departamento y especie de pulga obtenida se seleccionaron un ejemplar macho y hembra a los que se les realizó la extracción de ADN y amplificó mediante PCR un fragmento parcial del gen citocromo c oxidasa subunidad I (cox1) a fin de obtener secuencias y realizar estudios filogenéticos. Como resultados se recolectaron 617 pulgas identificadas morfológicamente como *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis* y *Pulex irritans*. Siendo *C. felis* la especie más prevalente (72,2%) y de mayor intensidad media (4,7) y abundancia media (3,4) en todos los departamentos. Para los análisis moleculares se seleccionaron 14 ejemplares abarcando las tres especies de pulgas, de los que se lograron amplificar 12 muestras para el gen cox1. Se obtuvieron fragmentos de entre 536 a 693 pares de bases, de los que nueve correspondían a pulgas (una secuencia de mala calidad) y tres a *Wolbachia* sp., una bacteria intracelular gramnegativa considerada un endosimbionte de los artrópodos. La identidad de las secuencias obtenidas al ser comparadas con las depositadas en el GenBank demostró una alta similitud con *C. felis* (n=3), *C. canis* (n=1) y *P. irritans* (n=4), lo que confirmó la identificación morfológica preliminar de las especies. Mediante el análisis filogenético se determinó que la secuencia obtenida de *C. canis* forma un clado con un 100% de soporte con secuencias asignadas a esta especie de diferentes partes del mundo. Lo cual demuestra la monofilia asignada a *C. canis* por otros autores. Por otra parte, las secuencias de nuestras muestras de *C. felis* se integran con un soporte del 100% al denominado clado 4 del grupo tropical I junto a ejemplares de África y Norteamérica. Estos resultados difieren a los obtenidos para la región, donde se habían hallado hasta el momento los clados 1 y 6, siendo el 4 nuevo para América del Sur. En el caso de *P. irritans*, nuestras secuencias se agrupan con las de Europa y Asia y se separan del clado generado por secuencias de *P. irritans* provenientes de Argentina. Lo cual concuerda con otros estudios que indican que los ejemplares de Argentina difieren filogenéticamente con los de Europa y Asia, correspondiendo probablemente a una especie críptica. En este estudio se confirma la presencia de *C. felis*, *C. canis*

y *P. irritans* en perros para el noreste de nuestro país, siendo el primero donde se determinan pulgas en base a la combinación de análisis morfológicos y moleculares.



## SUMMARY

Fleas are insects belonging to the order Siphonaptera, of which more than 2575 species are recognized, distributed in 15 or 18 families according to different authors. They are apterous with a laterally flattened body and a highly developed third pair of legs adapted for jumping. Adults are warm-blooded animals (mammals and birds) blood-sucking parasites. Meanwhile larvae have chewing mouthparts and feed on detritus. Regarding development, its metamorphosis is holometabolous, going through four stages: egg, larva, pupa and adult. From a health point of view, they are important vectors of diseases of medical and veterinary interest. The objective of this study was to identify morphologically and molecularly the flea species present in rural dogs in the northeast of Uruguay. For this purpose, 180 dogs in Artigas, Rivera and Tacuarembó departments were examined and the fleas obtained were classified morphologically at a specific level through the use of taxonomic keys. In addition, the following population rates were calculated: prevalence, mean intensity, and mean abundance. For each department and species of flea obtained, a male and female specimen were selected, which underwent DNA extraction and a partial fragment of the cytochrome c oxidase subunit I (cox1) gene was amplified by PCR in order to obtain sequences and carry out phylogenetic studies. As results, 617 fleas were collected and identified morphologically as *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis* and *Pulex irritans*. Being *C. felis* are the most prevalent species (72.2%) and with the highest mean intensity (4.7) and mean abundance (3.4) in all departments. For the molecular analysis, 14 specimens were selected, covering the three fleas species, of which 12 samples were amplified for the cox1 gene. Fragments between 536 and 693 base pairs were obtained, of which nine corresponded to fleas (poor quality for one sequence) and three to *Wolbachia* sp., a gram-negative intracellular bacterium considered an endosymbiont of arthropods. The identity of the sequences obtained when compared with those deposited in the GenBank showed a high similarity with *C. felis* (n=3), *C. canis* (n=1) and *P. irritans* (n=4), which confirmed the preliminary morphological identification of the species. Through phylogenetic analysis the sequence obtained from *C. canis* forms a clade with 100% support with sequences assigned to this species from different parts of the world was determined. This demonstrates the monophyly assigned to *C. canis* by other authors. On the other hand, the sequences of our *C. felis* samples integrate with 100% support to the so-called clade 4 of tropical group I together with specimens from Africa and North America. These results differ from those obtained for the region, where clades 1 and 6 had been found so far, clades 4 being new for South America. In the case of *P. irritans*, our sequences are grouped with those from Europe and Asia and are separated from the clade generated by *P. irritans* sequences from Argentina. This agrees with other studies that indicate that the specimens from Argentina differ phylogenetically from those from Europe and Asia, probably corresponding to acryptic species. This study confirms the presence of *C. felis*, *C. canis* and *P. irritans* in dogs in the northeast of our country, being the first where fleas are determined based on the combination of morphological and molecular analyses.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Las pulgas: origen e historia

Las pulgas son artrópodos pertenecientes a la clase Insecta y al orden Siphonaptera (gr. σιφων *siphon*, "canal, tubo" y απτερα *aptera*, "sin alas") (Bowman, 2011). Evolucionaron desde ancestros alados a lo largo del período Jurásico tardío o Cretácico temprano hace 125 a 150 millones de años (Durden y Traub, 2002).

Como grupo han evolucionado fundamentalmente como parásitos de mamíferos, donde el 94% de las especies que se conocen se alimentan de éstos y el 6% restante son ectoparásitos de aves. Ciertas especies de pulgas han moldeado su morfología en relación a la piel, pelaje o plumas del hospedador, esto refleja la evolución de las relaciones entre pulgas y sus hospedadores (Durden y Traub, 2002).

Las pulgas tuvieron un papel muy importante en la humanidad, por ser agentes transmisores de *Yersinia pestis*, el microorganismo causante de la Peste Bubónica, la cual generó tres pandemias a lo largo de la historia causando millones de muertes (Durden y Hinkle, 2019).

### 1.2. Clasificación taxonómica de las pulgas

Se han propuesto varios esquemas para la clasificación de las pulgas, uno de los más utilizados en la actualidad es el de Lewis (1998) que divide al orden Siphonaptera en 15 familias, siendo las más numerosas: Ctenophtalmidae, Ceratophyllidae, Leptopsyllidae, Pulicidae, Pygiopsyllidae, Rhopalopsyllidae e Ischnopsyllidae. Otros autores reconocen 18 familias, ya que dividen a la familia Pygiopsyllidae en tres familias y elevando a la subfamilia Tunginae, que estaba dentro de la familia Pulicidae, a una nueva familia, Tungidae. Se estima que en la actualidad el número de especies descritas de pulgas supera las 2575, en su mayoría adaptadas a roedores (Durden y Hinkle, 2019; Zhu, Hastriter, Whiting y Dittmar, 2015).

Las pulgas que poseen importancia médica y veterinaria son principalmente miembros de las familias Pulicidae, Ceratophyllidae, Tungidae, Leptopsyllidae y Vermipsyllidae. Ocasionalmente, miembros de otras familias como las de las familias Hystrichopsyllidae y Rhopalopsyllidae pueden alimentarse de humanos y animales domésticos (Durden y Hinkle, 2019).

La identificación para la clasificación taxonómica de las pulgas se ha realizado tradicionalmente estudiando la morfología de los especímenes adultos en base a determinadas estructuras anatómicas. Actualmente las técnicas de identificación mediante biología molecular son cada vez más utilizadas, especialmente para algunos grupos o complejos de especies (Lawrence et al., 2014; Zurita et al., 2019; Zurita, Lareschi y Cutillas, 2023).

Los machos de las pulgas tienen probablemente las genitalias más complejas del reino animal, es por ello que la morfología de estos órganos esclerotizados es

importante en la clasificación de casi la totalidad de las pulgas (Durden y Hinkle, 2019).

### 1.3. Morfología general de las pulgas

A continuación se detalla la morfología externa de larvas y adultos:

#### 1.3.1. Larvas

Las larvas se caracterizan por ser vermiformes, sin ojos, ápodas y tener numerosas setas gruesas a lo largo de su cuerpo, especialmente en los segmentos abdominales. La cabeza es bien desarrollada, armada con un par de mandíbulas masticadoras y un par de glándulas mandibulares de seda, para construir el capullo pupal. La mayoría de ellas pueden clasificarse a nivel de familia en función de la forma que presentan las papilas sensoriales ubicadas en la cabeza o por la distribución de las setas y órganos sensoriales (Durden y Traub, 2002).



**Figura 1:** Larvas de *Ctenocephalides felis* (tomado de Durden y Traub, 2002).

#### 1.3.2. Adultos

Las pulgas adultas miden de 1 a 8 mm, son ápteras (no poseen alas), generalmente son comprimidas bilateralmente y altamente quitinizadas. En los adultos las divisiones del cuerpo: cabeza, tórax y abdomen, se encuentran bien diferenciadas (Bowman, 2011). Las divisiones de una pulga adulta se muestran en la figura 2 y la morfología detallada en la figura 3. En la cabeza poseen un aparato bucal adaptado para picar y succionar.

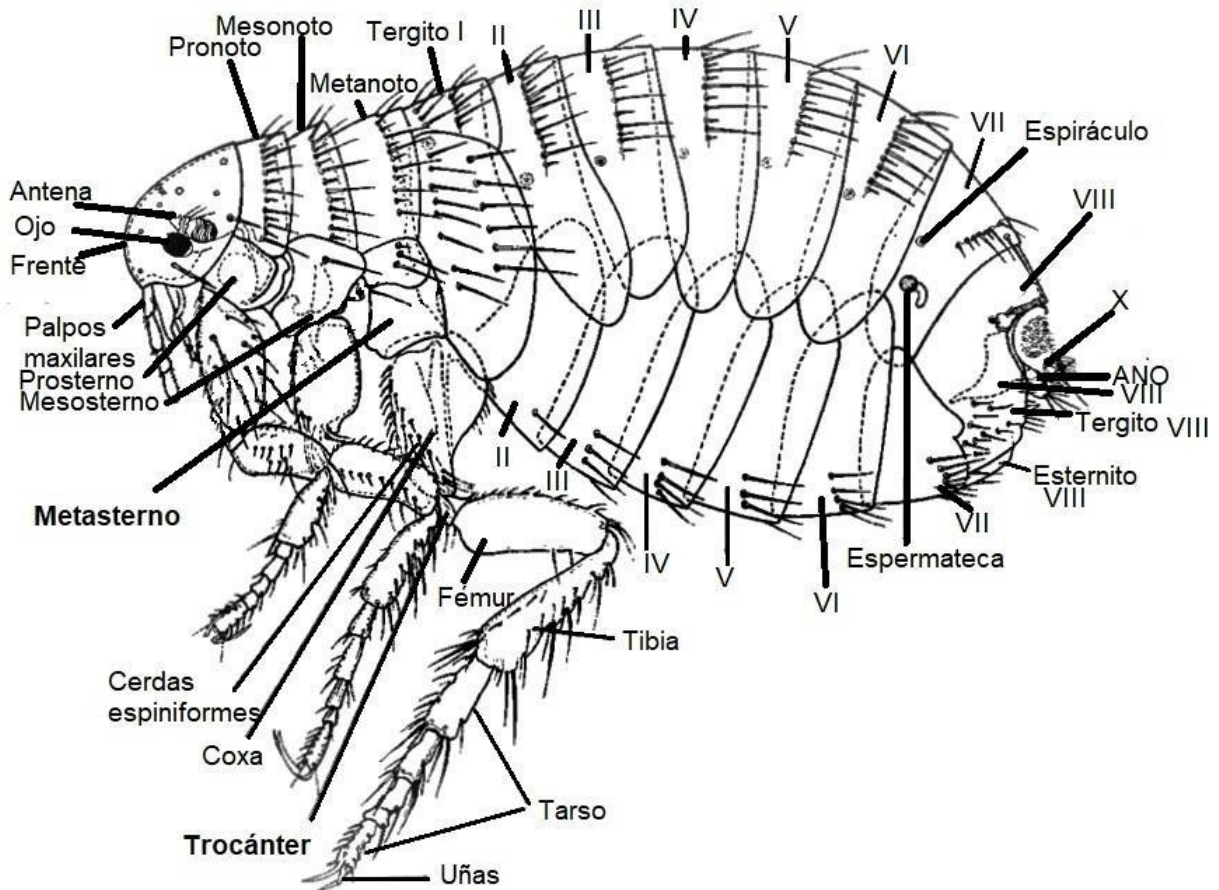
El tórax está dividido en tres partes donde se encuentran los tres pares de patas, el último par de patas está adaptado para el salto. El abdomen está dividido en 10

segmentos estando el primero reducido y los últimos cuatro modificados, donde se encuentran los genitales.



**Figura 2:** Fotografía de una hembra de *Ctenocephalides felis* con las divisiones del cuerpo (este estudio).

Varias especies presentan uno o más ctenidios que son estructuras queratinizadas formadas por un número variable de espinas o dientes. Pueden tener un ctenidio en el margen ventral de la cabeza llamado ctenidio genal y uno en el margen posterior del protórax llamado ctenidio pronotal, pueden existir ctenidios cefálicos o abdominales adicionales en algunas especies. Poseen filas de setas o cerdas especializadas en varias regiones del cuerpo. La condición de los ctenidios y las setas especializadas puede revelar el pelaje o los hábitos del hospedador, particularmente en las especies de pulgas con mayor especificidad. Se cree que los ctenidios protegen las articulaciones flexibles (Durden y Traub, 2002).



**Figura 3:** Diseño de la morfología detallada de una hembra de sifonáptero generalizado (modificado de Linardi y Guimarães, 2000).

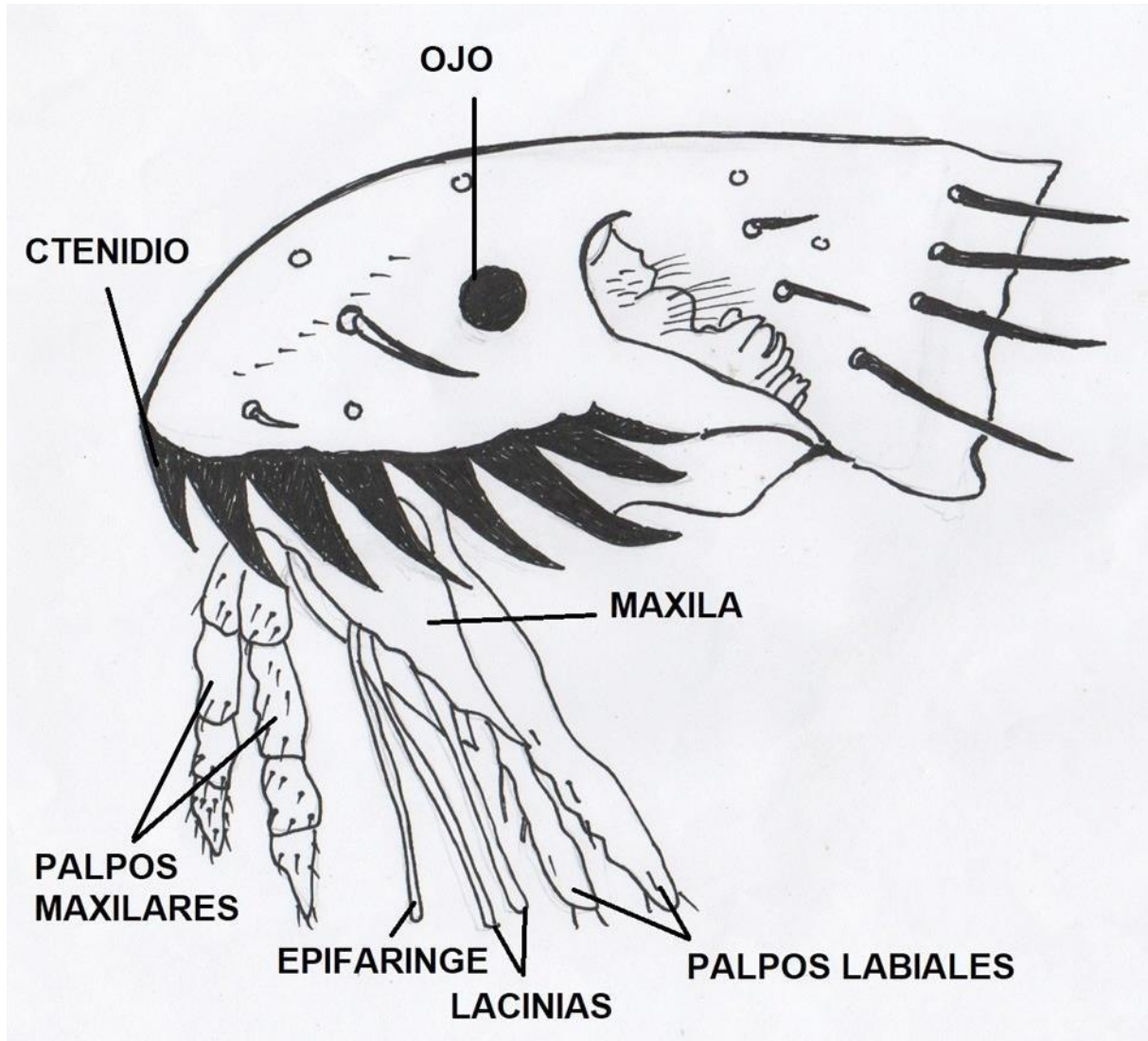
### 1.3.2.1. Cabeza (Figura 4)

Es inmóvil y su forma varía en los diferentes géneros, es muy útil en la identificación de las especies. La parte anterior de la cabeza llamada frente o clipeo (figura 3) está separada de la parte posterior u occipucio por la sutura antenal. En la parte frontal de la cabeza hay un tubérculo denominado tubérculo frontal. Poseen antenas compuestas por tres segmentos, escapo, pedicelo y flagelo o clava (subdividido en flagelómeros) que están situadas en las depresiones laterales denominadas surco antenal, en algunas especies este surco no es completo, siendo solo un vestigio. La parte inferior de la cabeza puede o no estar protegida por un ctenidio genal que en ocasiones es vestigial.

Los ojos son simples y pueden estar presentes o ausentes, en ocasiones incluso reducidos a una especie de mancha ocular.

Las piezas bucales están adaptadas para perforar la piel y succionar sangre, 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). 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, son quitinizados y divididos en cuatro regiones invariables. Por último, se encuentran unos orificios con aspecto de puntos de implantación de setas en la parte anterior y posterior de la cabeza que se les describe con el nombre de lucodiscos (Guimarães, Tucci y Barros-Battesti, 2001.; Linardi y Guimarães, 2000).



**Figura 4:** Esquema de la cabeza de adulto de un sifonáptero generalizado (modificado de Linardi y Guimarães, 2000).

### 1.3.2.2. Tórax

Existen tres segmentos torácicos bien diferenciados: protórax, mesotórax y metatórax. Constando cada uno de una porción dorsal denominada noto o tergita y otra ventral como esternita. Por lo que dorsalmente se denominan pronoto, mesonoto y metanoto y ventralmente prosterno, mesosterno y metasterno (Figura 3). El pronoto puede o no presentar ctenidio pronotal con mayor o menor cantidad de espinas o dientes el cual a veces es vestigial o incluso localizado en el metanoto.

Existen un par de espiráculos en cada uno de los segmentos (Beaucournu y Launay, 1990; Linardi y Guimarães, 2000; Zurita Carrasco, 2018).

Las patas en los sifonápteros se disponen en tres pares, de los cuales, el último se encuentra más desarrollado. La función de este último par es proporcionar a la pulga una gran capacidad de salto, lo cual es fundamental para lograr colonizar nuevos hospedadores. El tercer par es considerado como el más importante desde el 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: fémur, tibia y tarso, completando así los apéndices ambulatorios. El tarso a su vez está dividido en cinco segmentos o tarsómeros, de los cuales el segmento más apical denominado distitarsómero termina en un par de uñas simétricas o asimétricas. 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. En cuanto a las coxas, 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 del tercer par de patas 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; Zurita Carrasco, 2018).

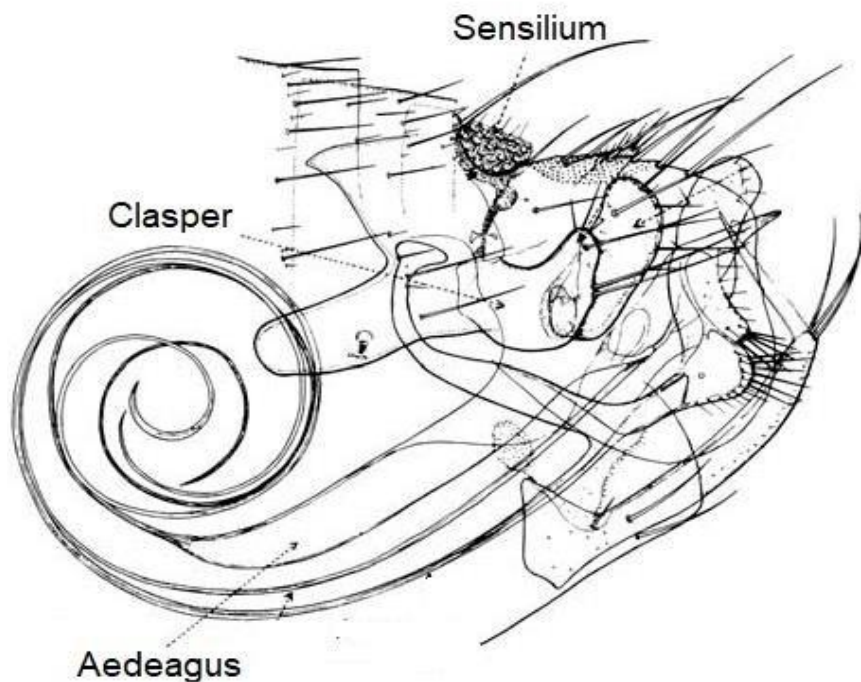
### **1.3.2.3. Abdomen**

Los segmentos abdominales se dividen en tergitos (dorsales) y esternitos (ventrales) (Figura 3). Cada pulga suele presentar diez tergitos y nueve esternitos, los cuales son nombrados mediante números romanos. Los tergitos por regla general no se encuentran modificados, pero en algunos géneros aparecen gruesas incrustaciones 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 en diferentes especies. 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 citado por Zurita Carrasco 2018; Linardi y Guimarães, 2000). Así, el tergito VIII en las hembras está muy desarrollado cubriendo casi toda o toda la porción terminal del abdomen. Este segmento es de gran importancia taxonómica debido a que en un gran número de géneros la conformación y la quetotaxia de su margen caudal son usados como criterios para la diferenciación 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 aún 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 5), una estructura formada por una placa de pequeñas espículas localizada al final del cuerpo de la pulga, 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 citado por Zurita Carrasco 2018).

#### 1.3.2.4. Segmentos modificados

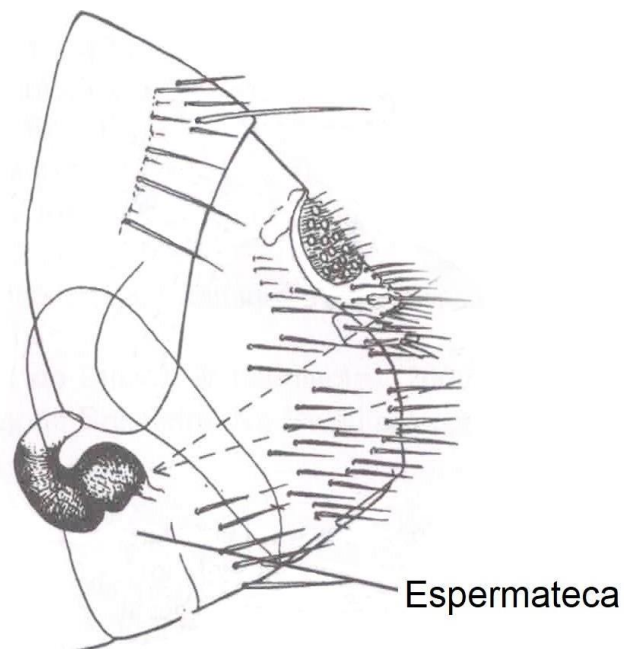
En los machos el órgano copulador presenta un aspecto enrollado en la mayoría de las especies y se le denomina aedeagus, es una estructura extremadamente compleja (Figura 5). Las estructuras asociadas al aedeagus que derivan de los tergitos terminales son las principales estructuras que se utilizan para llevar a cabo diferenciaciones 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, siendo muy útiles en la identificación a nivel de género y especie. El esternito IX está conformado por dos partes diferentes que se encuentran fusionadas ventralmente. De esta forma, 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 (Figura 5), que se presenta dividida en una parte fija, basímero y una parte móvil denominada telómero (Beaucournu y Launay, 1990; Lewis, 1993 citado por Zurita Carrasco, 2018; Linardi y Guimarães, 2000; Zurita Carrasco, 2018).



**Figura 5:** Genitalia de pulga macho (modificado de Smit, 1957).



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 gran importancia taxonómica. Se puede observar la presencia de una estructura denominada espermateca (Figuras 3, 6) que se divide en dos regiones: bulga (cuerpo o cabeza) e hilla (apéndice caudal), pudiendo existir una línea demarcatoria que divide ambas regiones. El orificio en el cual se encuentra situada la espermateca se conoce con el nombre de área cribiforme. En determinados individuos se puede lograr apreciar a simple vista un conducto denominado bolsa copuladora que da lugar a una continuación alargada de la propia espermateca. 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 citado por Zurita, 2018; Linardi y Guimarães, 2000, Zurita Carrasco, 2018).



**Figura 6:** Segmento posterior de abdomen y espermateca de hembra de pulga (Modificada de Guimarães et al., 2001).

#### **1.4. Biología de las pulgas**

Son hematófagos en su etapa adulta y parasitan animales de sangre caliente (mamíferos y aves), siendo sus larvas detritívoras-masticatorias.

Son insectos de metamorfosis completa (holometábolos), su ciclo biológico pasa por cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 7). La cópula se realiza pocos días después de que el adulto sale de la cápsula pupal. El período de oviposición va a depender del estado nutricional de las hembras, según la especie se realiza en el

hospedador o directamente en el suelo del entorno frecuentado por este. En el caso de *Pulex irritans* deposita sus huevos en grietas de pisos. Los huevos son blanquecinos, ovoides o elipsoidales, midiendo de 300 a 700 micras de largo. El número de huevos varía de acuerdo a la especie, generalmente las hembras producen varias centenas a lo largo de su vida y cada postura varía de 2 a 25 huevos puestos en intervalos de uno a dos días (Guimarães et al., 2001; Durden y Traub, 2002).

Bacot (1914) observó una hembra de *P. irritans* depositar alrededor de 448 huevos en un periodo de 196 días. La eclosión de los huevos puede ocurrir desde uno a tres días, variando en diferentes especies (Guimarães et al., 2001).

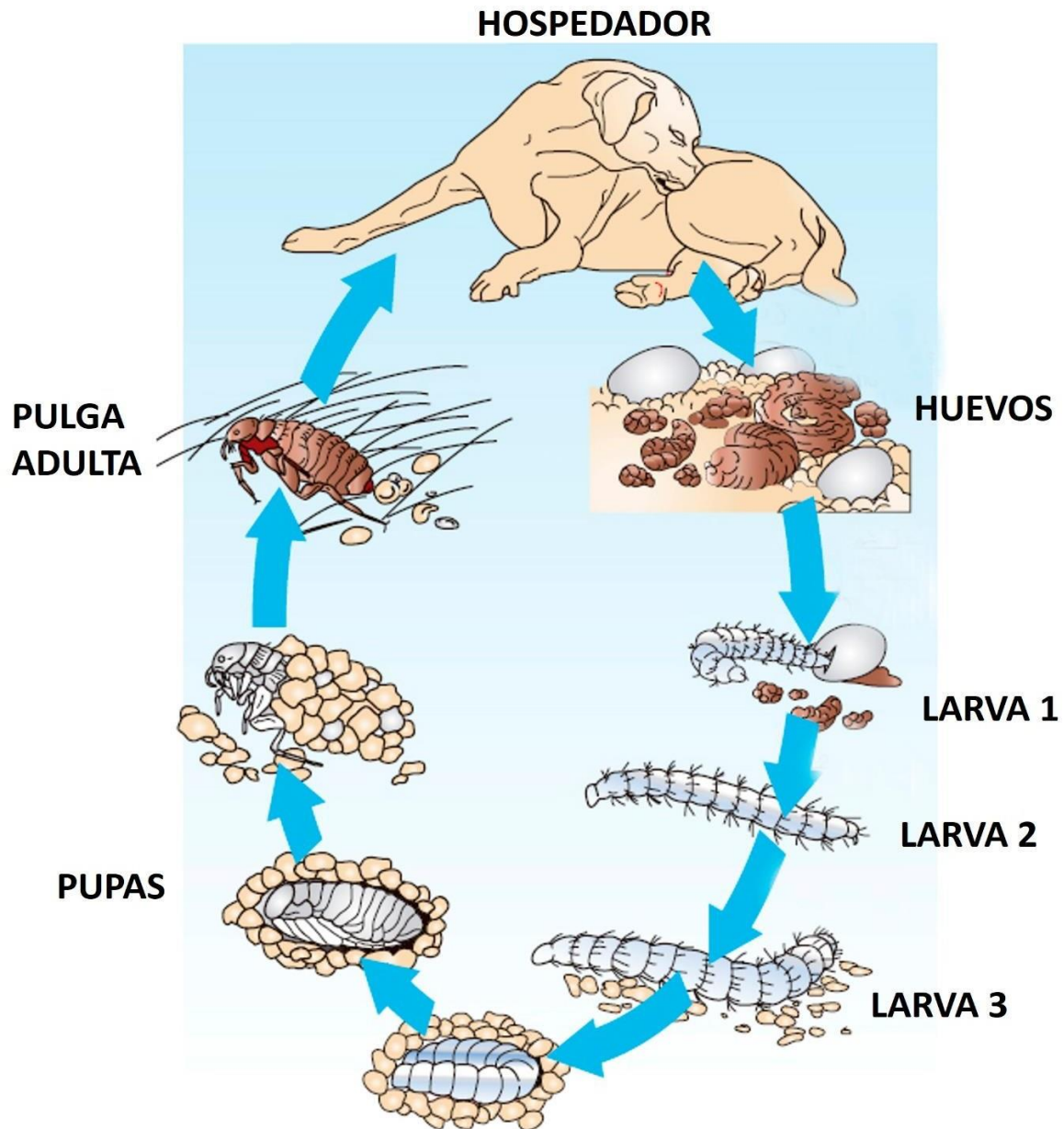
En general, el período de huevo a adulto ocurre aproximadamente en 25 a 30 días (Guimarães et al., 2001). En el caso de *Ctenocephalides felis*, si la temperatura y la humedad relativa está dentro de los rangos de 13°C a 32°C y 50% a 92% respectivamente, el ciclo puede cumplirse entre 14 a 140 días (Bowman, 2021). La longevidad del adulto también depende de la especie, de la alimentación y de las condiciones ambientales. Se observó que *P. irritans* alimentada puede vivir hasta 513 días (Guimarães et al., 2001).

De la eclosión de los huevos surgen las larvas que son de aspecto vermiforme, poseen aparato bucal masticador y se alimentan de detritos orgánicos y proteínicos como pelos y plumas. La sangre expulsada en la materia fecal de las pulgas adultas, después de la succión, al adherirse con otros detritos orgánicos es el alimento preferido por las larvas, pudiendo ser indispensable para ciertas especies. Generalmente pasan por dos mudas hasta llegar al tercer estadio. La larva teje un capullo fino de seda de forma oval conformado por una sustancia adherente, pasando a ser pupa. Diversas partículas encontradas en el sustrato se unen al capullo y sirven como camuflaje. La fase pupal puede variar de 10 días a más de un año, dependiendo de la especie, temperatura y la humedad del ambiente (Guimarães et al., 2001). Como ejemplo, Bacot (1914) observó que la fase de pupa de *Ctenocephalides canis* puede llegar hasta 334 días.

Después de emerger de la cutícula pupal, el adulto permanece dentro del capullo hasta ser estimulado por el aumento de la temperatura o por la vibración generada por la presencia de un hospedador al volver al nido o madriguera. Pocos minutos después de la eclosión, las pulgas adultas buscan una fuente de alimento, de igual forma pueden permanecer sin alimentarse por algunas semanas o más.

Cunha (1914) describe que la alimentación de las pulgas dura cerca de 20 minutos, después de una alimentación completa no se alimentan nuevamente hasta las 48 horas siguientes. Después de cinco minutos de iniciada la succión las pulgas defecan, proyectando pequeñas gotas espesas a una distancia aproximada de un centímetro. La actividad es diurna o nocturna para pulgas que pican al hombre, en la noche estando el hospedero en reposo genera condiciones más favorables para la alimentación sin interrupciones (Guimarães et al., 2001). Las especies del género *Ctenocephalides* se alimentan de forma intermitente porque son especies que viven en el pelaje de los hospederos. Especies que viven fuera de los hospederos, los

buscan solo para la hematofagia, por ejemplo *P. irritans* o especies que esperan a los hospederos en los nidos como las pulgas de aves (Guimarães et al., 2001).



**Figura 7:** Esquema del ciclo biológico de *Ctenocephalides felis* (modificado de Bowman, 2021).

### 1.5. Importancia sanitaria de las pulgas para humanos y animales

Desde el punto de vista sanitario son importantes como vectores de enfermedades de importancia médica y veterinaria. Se destacan la peste bubónica, bartonelosis, tifus murino y mixomatosis entre otras, también son hospedadores intermediarios de parásitos como *Dipylidium caninum*. Además, su picadura causa cuadros pruriginosos y de hipersensibilidad (Durden y Hinkle, 2019).

## **1.5.1. Principales patógenos transmitidos**

### **1.5.1.1. *Rickettsia typhi***

Es el agente del Tifus murino, una enfermedad rickettsial causada por una pequeña bacteria intracelular obligada. Transmitido principalmente por heces de la pulga *Xenopsylla cheopis*, otro tipo de transmisión puede ser por el aplastamiento de la pulga e inoculación del agente. Los reservorios son roedores del género *Rattus* (Linardi y Guimaraes, 2000). Pulgas infectadas transmiten la enfermedad a ratas peridomésticas manteniendo el ciclo en cercanía al humano. Al alimentarse la pulga deposita sus heces contaminadas cerca del sitio de picadura y el humano al momento de rascarse la zona picada provoca la entrada de la rickettsia a través de la piel lesionada, dando lugar así a la infección. El periodo de incubación es de 6 a 14 días y los síntomas son erupción cutánea, fiebre alta, postración, delirio y coma en casos graves. La tasa de letalidad suele ser baja, cerca del 5% en pacientes no tratados (Durden y Hinkle, 2019).

### **1.5.1.2. *Yersinia pestis***

Es el agente de la Peste bubónica, es un coccobacilo gramnegativo que provoca una grave zoonosis la cual es transmitida por la pulga de la rata oriental *Xenopsylla cheopis*, así como otras especies del género *Xenopsylla* (Durden y Hinkle, 2019). El hombre es un huésped accidental que adquiere la infección por picadura de pulgas, arañazos o mordedura de animales, manipulación de tejidos animales, consumo de comida contaminada o exposición de laboratorio. La enfermedad se presenta con tres síndromes clínicos: peste bubónica (80%-95%), septicémica (10%-20%) y neumónica (2%-5%). La peste se asocia con gran infectividad, rápida diseminación y alta mortalidad, siendo su período de incubación de dos a ocho días. La peste bubónica se inicia súbitamente con fiebre, escalofríos, cefalea y tumefacción ganglionar dolorosa; más del 50% de casos no tratados evolucionan a sepsis y shock séptico; entre el 5%-15% de pacientes con peste bubónica y septicémica se desarrolla secundariamente compromiso pulmonar (peste neumónica secundaria). Sin tratamiento la letalidad de la peste bubónica es del 50%-60%, mientras que la de la peste septicémica y neumónica es cercana al 100%. El diagnóstico y el tratamiento precoz apropiado reduce la mortalidad por peste bubónica y septicémica a un 5%-15% (Meregildo y Villegas, 2019).

La primera pandemia se denominó “La Plaga de Justiniano” (emperador romano de dicha época), que comenzó en el siglo VI en el norte de África, extendiéndose por toda Europa Mediterránea hasta el siglo VII, causando la muerte de aproximadamente 40 millones de personas. La segunda pandemia fue llamada “Peste Negra”, debiendo su nombre a las lesiones provocadas en los afectados, tuvo origen en el centro de Asia en el siglo XIV y se extendió a Europa, generando más de 25 millones de muertes tan solo en este continente, duró más de 200 años. La tercera pandemia denominada “Peste Moderna” se extendió por todo el mundo a finales del siglo XIX y causó 12 millones de muertes tan sólo en la India. Cada año se registran de 1000 a 3000 casos de Peste, la mayoría en África, siendo

Madagascar y República Democrática del Congo los países con más reportes de casos (Durden y Hinkle, 2019).

#### **1.5.1.3. *Rickettsia felis***

Es el agente etiológico de la fiebre manchada transmitida por pulgas, cuyo principal vector es *Ctenocephalides felis* (Faccini et al., 2013). Es un patógeno bacteriano intracelular que se transmite de la pulga a los huéspedes vertebrados. Esta infección ha sido identificada a nivel mundial, considerada como un patógeno emergente, típicamente asociado con síntomas clínicos similares a otras rickettsiosis como cefalea, escalofríos, fiebre, mialgia y erupción cutánea. Pudiendo generar complicaciones que involucran síntomas neurológicos (Fongsaran et al., 2022).

#### **1.5.1.4. *Bartonella* spp.**

Agentes de las bartonelosis entre ellas la “enfermedad por arañazo de gato”. Son bacterias gramnegativas, aerobias, no móviles, que se comportan como intracelulares facultativos, viven dentro de los glóbulos rojos.

La transmisión se da principalmente por arañazo y/o mordisco de gatos o perros, con una mayor incidencia en los pacientes que poseen gatos menores de un año.

El período de incubación en humanos varía de 5 a 20 días, en la puerta de entrada o zona de inoculación se observan por lo general pequeñas pápulas eritematosas o pústulas. En la evolución del proceso, los pacientes presentan adenopatías, a veces dolorosas, cercanas a los puntos previos de inoculación (axila, cuello, ingle). Principalmente se localizan en la parte superior del cuerpo. La afectación oculo ganglionar o síndrome de Parinaud (conjuntivitis y linfadenopatía preauricular) es una forma de enfermedad por arañazo de gato que representa hasta el 6% de los casos. El proceso suele ser benigno y en la mayoría de los casos las linfadenopatías se resuelven de modo espontáneo en el curso de varios meses, si bien en el 10% puede producirse una supuración y fistulización. Durante el curso clínico de la enfermedad se ha descrito algunos síntomas como fiebre, mal estado general, anorexia, cefalea, exantema y artralgias (Blanco y Raoult, 2005).

Otro agente que puede ser transmitido por las pulgas es *Bartonella elizabethae*, que puede dañar las válvulas del corazón causando a menudo inflamación (endocarditis). Las infecciones por este agente zoonótico causan inflamación de los ganglios linfáticos regionales y bacteriemia a largo plazo. Los gatos infectados son reservorios importantes (Durden y Hinkle, 2019). La pulga *Ctenocephalides felis* fue capaz de transmitir experimentalmente esta infección (Guimarães et al., 2001).

#### **1.5.1.5. *Francisella tularensis***

Es el agente causal de la Tularemia. Es una bacteria aeróbica, gramnegativa y pleomórfica. Existen diferentes cepas que afectan determinadas especies y con grados de patogenicidad variable, *F. tularensis* es transmitida por muchos artrópodos que se alimentan de sangre como garrapatas, moscas, mosquitos y pulgas (Nicholson, Sonenshine, Noden y Brown, 2019). También es transmitido por el manejo de animales, la inhalación de polvo contaminado, beber agua infectada y

comer carne infectada insuficientemente cocinada. Algunos de los síntomas presentes son fiebre, dolor de cabeza y náuseas, generalmente acompañadas por el desarrollo de una lesión ulcerada en el sitio de inoculación. Otras manifestaciones clínicas incluyen agrandamiento de los ganglios linfáticos regionales, neumonía y ocasionalmente una erupción. Los cuadros clínicos pueden ser diferentes, el más común es la forma ulceroglandular. La forma neumónica es particularmente probable que produzca enfermedades graves, pudiendo tener una evolución crónica si no es tratada (Nicholson et al., 2019).

#### **1.5.1.6. *Coxiella burnetii***

Es el agente de la Fiebre Q, puede ser transmitido por pulgas y también por otros artrópodos que se alimentan de sangre, por tejidos de mamíferos infectados, por fomites infecciosos o por aerosoles (Durden y Hinkle, 2019).

#### **1.5.1.7. Otras bacterias**

También están relacionadas a casos de salmonelosis causados por *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* (Guimarães et al., 2001).

#### **1.5.1.8. Mixoma molitor**

Virus agente de la mixomatosis de conejos, transmitida por la pulga *Spylopsyllus cuniculi* (Guimarães et al., 2001).

### **1.5.2. Como hospedadores intermediarios**

Algunas pulgas alojan cisticercoides de tres especies de cestodos, las cuales ocasionalmente infectan humanos. El rol como hospedador intermediario más importante de las pulgas es para el cestodo *Dipylidium caninum*, cuyos adultos parasitan a los perros y gatos. Los proglótidos grávidos son liberados por los adultos de *D. caninum* en el intestino del hospedador definitivo, estos salen activamente por el ano secándose al exponerse al aire. Los huevos expulsados son luego ingeridos por larvas de pulgas, esto se da debido a que estas presentan mandíbulas masticatorias que les permite ingerir los huevos, mientras que las pulgas adultas tienen piezas bucales chupadoras y no pueden ingerir los huevos. Pulgas como *C. felis*, *C. canis* y *P. irritans* tienen un rol importante como hospedadores intermediarios de este cestodo. El desarrollo de esta tenia se produce de forma lenta en las larvas y de forma más rápida en las pupas. Los cisticercos se logran ver en la cavidad del cuerpo de larvas y pupas los cuales permanecen durante el desarrollo de la pulga hasta su etapa adulta. Debido a estos helmintos ocurre algo de mortalidad en la etapa de pupa. Los otros dos cestodos que utilizan pulgas como hospedadores intermediarios son *Hymenolepis diminuta* e *Hymenolepis nana*. Estas parasitan a roedores y ocasionalmente a humanos. Los mecanismos de desarrollo y transmisión de ambos cestodos son muy similares a los de *D. caninum*.

Tanto *H. diminuta* como *H. nana* desarrollan cisticercos viables en distintas especies de pulgas, fundamentalmente en *C. canis*, *P. irritans*, *X. cheopis* y *Nosopsyllus fasciatus* (Durden y Traub, 2002). También son hospedadores intermediarios del

nematodo *Diptelonema reconditum* que se desarrolla en la cavidad general de pulgas *C. canis* y *C. felis*. El desarrollo larvario de *Dirofilaria immitis* fue obtenido en *X. cheopis*, *P. irritans*, *Echidnophaga gallinacea* y *Orchopeas howardi* (Stueben, 1954 citado por Guimarães et al., 2001). Como ejemplo de hospedero intermediario de protozoarios tenemos a *Trypanosoma lewisi*, con evolución en roedores sinantrópicos. La transmisión ocurre por la contaminación fecal. Las pulgas involucradas en la transmisión son *X. cheopis*, *C. canis* y *N. fasciatus* (Guimarães et al., 2001).

### **1.5.3. Pulicosis alérgica, otras hipersensibilidades**

Las picaduras de las pulgas causan reacciones como la Dermatitis Alérgica de pulgas (DAPP), que se produce por una reacción de hipersensibilidad a compuestos de la saliva de las pulgas. En el individuo sensibilizado, los sitios de picadura se convierten en pápulas, causando una forma de urticaria papular, a menudo formando ronchas. En casos más graves puede ocurrir descamación y endurecimiento o decoloración de la piel. Las heces y partículas del exoesqueleto de las pulgas que se encuentran en el ambiente pueden ser una fuente de alérgenos para individuos sensibilizados (Durden y Hinkle, 2019).

#### **1.5.3.1. Tungiasis**

Es la condición patológica resultante de la infestación por *Tunga penetrans*. Las hembras de *T. penetrans* generalmente invaden sitios en la planta de los pies, debajo de los dedos y uñas de los pies. Otros sitios afectados pueden ser las manos, piernas, brazos (especialmente alrededor del codo) y la región genital en infestaciones graves (Durden y Hinkle, 2019).

## **1.6. Estudios moleculares en la clasificación y filogenia de las pulgas**

El desarrollo de tecnologías basadas en la genética ha contribuido a complementar la clasificación morfológica tradicional, la cual, en cierta medida tiene sus limitaciones. Los métodos moleculares son actualmente utilizados para el estudio de la taxonomía, sistemática y genética de poblaciones de muchos organismos, incluidas las pulgas (Lawrence et al., 2019; Zhang et al., 2022).

Actualmente la mayoría de los trabajos sobre taxonomía de pulgas combinan trabajos morfológicos con moleculares. Entre los principales marcadores moleculares estudiados en pulgas están: citocromo c oxidasa subunidad I (cox-1), citocromo c oxidasa subunidad II (cox-2), espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), histona H3 (H3) y factor de elongación (Ef-1 $\alpha$ ), entre otros (Azrizal-Wahid, Sofian-Azirun y Low, 2020; Lawrence et al., 2019; Zurita et al., 2023). En nuestra región se han realizado estudios filogenéticos moleculares que incluyen a *C. felis*, *C. canis*, *P. irritans* y especies de pulgas parásitas de animales silvestres (Zurita et al., 2019; Zurita et al., 2023). A nivel mundial Lawrence et al. (2019) utilizando análisis multigénicos determinaron la presencia de cuatro grupos bioclimáticos para *C. felis*, los cuales a su vez se subdividen en ocho clados.

### **1.7. Pulgas de importancia sanitaria en carnívoros y humanos en Uruguay**

Las principales especies de pulgas de importancia para carnívoros y humanos en Uruguay son *C. felis*, *C. canis*, *P. irritans*, *X. cheopis* y *T. penetrans* (Carballal Pereira y Galliazzi Cavalheiro, 2015; Castro y Trenchi, 1955; Castro, Valledor, Crampet y Casás, 2013; Conti-Díaz, 1999; Gaminara, 1929; Venzal et al., 2006).

A pesar de lo frecuentes y de su importancia sanitaria, los reportes formales de pulgas en perros en Uruguay son puntuales y más aún en el norte del país, por lo que en este estudio se pretende establecer las especies de pulgas que parasitan perros rurales en el noreste del país, así como establecer relaciones filogenéticas.

## **2. HIPÓTESIS**

Las especies de pulgas presentes en perros rurales del noreste de Uruguay serán las mismas que las halladas en perros de países de la región y se relacionan filogenéticamente entre ellas.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

- Determinar mediante morfología y biología molecular las especies de pulgas que parasitan perros rurales del noreste del Uruguay.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Identificar las especies por morfología utilizando claves específicas.
- Obtener secuencias de un fragmento del gen *cox-1* (citocromo c oxidasa subunidad I) para cada especie y compararlas con las depositadas en bases de datos como Genbank.
- Realizar estudios filogenéticos de las pulgas halladas en perros del noreste de Uruguay y relacionarlas con otras especies de la región.
- Calcular la prevalencia, intensidad y abundancia media en general y para cada especie de pulga, así como su distribución para cada departamento estudiado (Artigas, Rivera y Tacuarembó).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Obtención de las pulgas**

#### **4.1.1. Muestreos**



El muestreo se realizó en zonas rurales del noreste del Uruguay, abarcando tres departamentos: Artigas, Rivera y Tacuarembó. Las colectas se realizaron en establecimientos y casas rurales de diferentes parajes, formando una línea que abarcó dichos departamentos, tomando en cuenta rutas y caminos vecinales.

#### **4.1.2. Obtención de las muestras**

Se realizaron tres muestreos durante los meses de abril, mayo y junio del 2022 con el objetivo de muestrear un mínimo de 50 perros en cada departamento.

Este estudio contó con la aprobación de la Comisión de Ética para el uso de Animales (CEUA) del CENUR Litoral Norte (N° de expediente 311170-00002422) del 29 de abril de 2022, dicha aprobación es un requisito para los protocolos que requieren la manipulación de animales.

#### **4.1.3. Recolección de las pulgas**

En cada establecimiento o casa rural visitada se le informó al dueño el motivo de la visita y se le solicitó autorización para revisar y extraer pulgas de los perros presentes. Con el objetivo de obtener información se le realizaron algunas preguntas como por ejemplo; nombre del perro, raza, sexo, tratamiento ectoparasiticida (último tratamiento y con qué principio activo) siendo este un criterio de exclusión de acuerdo al principio activo utilizado, así como el temperamento del animal (agresividad y/o nerviosismo). Para la maniobra estuvo siempre presente el dueño o tenedor (capataz, casero, etc.) de los animales. La maniobra utilizada consistía en colocar el perro (con uso de bozal) en decúbito supino para revisar la parte ventral, luego pararlo y revisar la zona dorsal. Se neutralizaron las pulgas con un algodón embebido en alcohol 70° y se las extraían de forma manual para ser depositadas en frascos con alcohol 95° para su conservación. Para cada animal el tiempo de extracción fue de 3 minutos. Todas las pulgas extraídas de un mismo perro se colocaron en un frasco identificado. Cada muestra fue identificada con un orden correlativo de N° de muestra y departamento. Posteriormente a cada muestreo las pulgas fueron llevadas al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas (LVyET) del CENUR Litoral Norte – Salto, UdelaR para su estudio.

#### **4.2. Clasificación morfológica de las pulgas**

Una vez en el laboratorio las pulgas fueron extraídas de los tubos, colocadas en cajas de Petri y clasificadas morfológicamente en forma individual mediante el uso de una lupa estereoscópica binocular y en base a las claves establecidas por Guimarães et al. (2001), Linardi y Guimarães (2000) y Linardi y Santos (2012). Además, fueron fotografiados utilizando una cámara NIKON modelo DS-Fi3 los ejemplares representativos de pulgas de cada especie, sexo y departamento a modo de registro ya que fueron destruidas para la obtención de ADN.

Una vez caracterizados los individuos a nivel de especie y diferenciados en machos y hembras se los almacenó en tubos de 1,5 ml (tipo eppendorf) con alcohol 95° y su respectiva identificación.

Con los datos obtenidos para cada muestra se elaboró una base de datos mediante planilla Excel a fin de calcular los siguientes índices poblacionales: prevalencia (P=; porcentajes de perros parasitados), intensidad media (IM=; n° total de pulgas / n° de perros parasitados) y abundancia media (AM=; n° total de pulgas / n° de perros examinados), siguiendo a Bush, Lafferty, Lotz y Shostak (1997). Para la prevalencia se calcularon los intervalos de confianza del 95% según Daniel (1998).

### **4.3. Amplificación del ADN y obtención de secuencias del gen *cox1* (citocromo c oxidasa subunidad I) de pulgas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

#### **4.3.1. Extracción de ADN**

El ADN se extrajo de un macho y una hembra de cada especie de pulga obtenida para cada departamento. La extracción se realizó utilizando el kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania) siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado y evaluada su pureza por espectrofotometría mediante el uso del equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

#### **4.3.2. Amplificación del gen *cox1* de pulgas mediante PCR**

La amplificación del ADN se realizó mediante PCR a tiempo final. Para ello se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores que amplifican un fragmento del gen citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*), los cuales se detallan en la tabla 1. El primer protocolo de PCR utilizado fue con los cebadores HCO2198 y LCO1490 propuestos por Folmer, Black, Hoeh, Lutz y Vrijenhoek (1994) que amplifica un fragmento de aproximadamente 601 pares de bases (pb). Las condiciones fueron las establecidas por Lawrence et al. (2015). También se repitió este protocolo bajo las condiciones de Zurita et al. (2019) que amplifica fragmentos en un rango de 600 a 670 pb.

Además, se realizó un protocolo complementario combinando el cebador LCO1490 con el Cff-R propuesto por Lawrence et al. (2014) bajo las condiciones de Zurita et al. (2019) y Zhang et al. (2022) que amplifican un fragmento de 491 pb aproximadamente. Como controles positivos se utilizó ADN de *Paramphistomum* sp., *Ornithodoros hasei*, *Ixodes fuscipes* y *Haemaphysalis juxtakochi* y como control negativo se utilizó agua de grado molecular.

Los productos resultantes de las PCRs se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con GoodView Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co. Ltd., China) y examinados mediante un transiluminador UV.

**Tabla 1.** Cebadores utilizados en el estudio.

Cebador	Secuencia	Referencia
<b>LCO1490</b>	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al. (1994)
<b>HCO2198</b>	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	
<b>Cff-R (S0368)</b>	5'-GAAGGGTCAAAGAATGATGT-3'	Lawrence et al. (2014)

#### **4.3.3. Obtención de las secuencias y análisis filogenéticos**

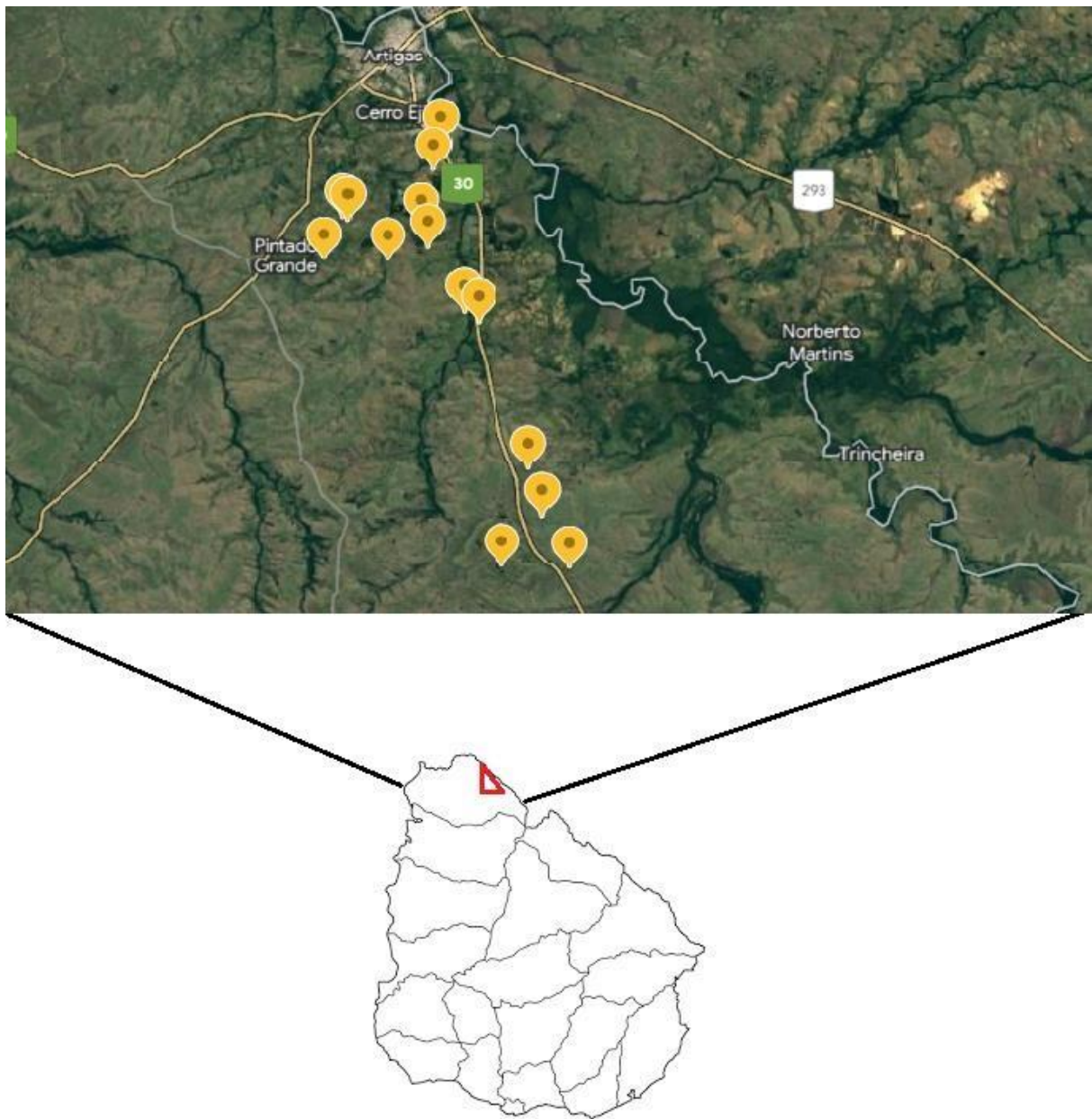
Los amplicones del tamaño esperado fueron purificados mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania) y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas y las especies próximas obtenidas del GenBank se realizaron mediante el software MEGA 7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016) utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Tamura 3 parámetros (Tamura, 1992). El soporte de los nodos fue determinado usando 1000 réplicas de bootstrap. Como grupo externo se incluyó a *Panorpa meridionalis* (Mecoptera: Panorpidae), número de acceso GenBank: LT604125.

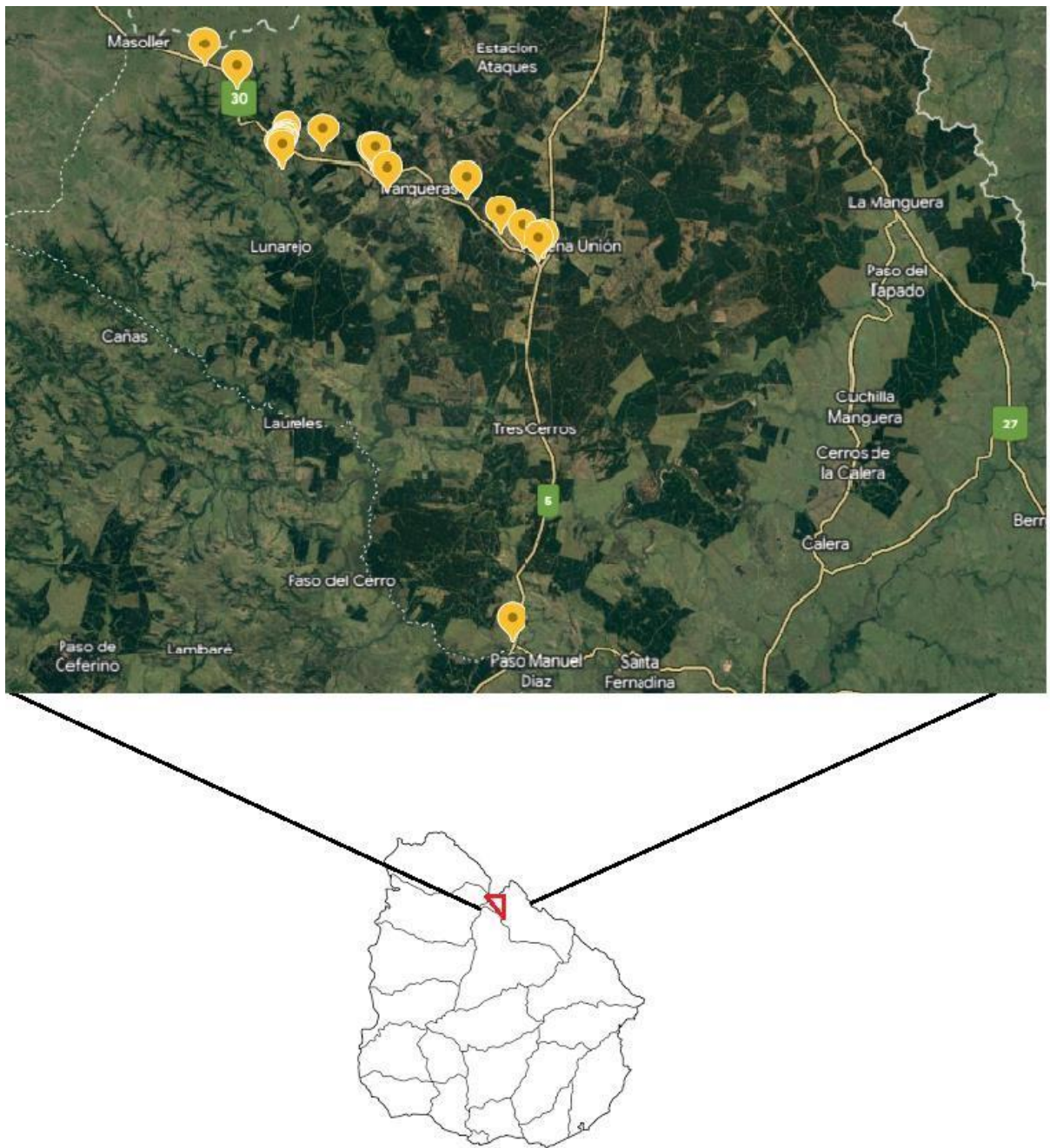
## **5. RESULTADOS**

Durante los muestreos en los tres departamentos (Figuras: 8, 9 y 10) se examinaron 180 perros en diferentes localidades de zonas rurales, de los cuales 52 pertenecían a Artigas, 68 a Rivera y 60 a Tacuarembó. En la tabla anexa 1 se detallan los datos de localidad con coordenadas, fecha, especie y sexo de pulga para cada perro examinado.

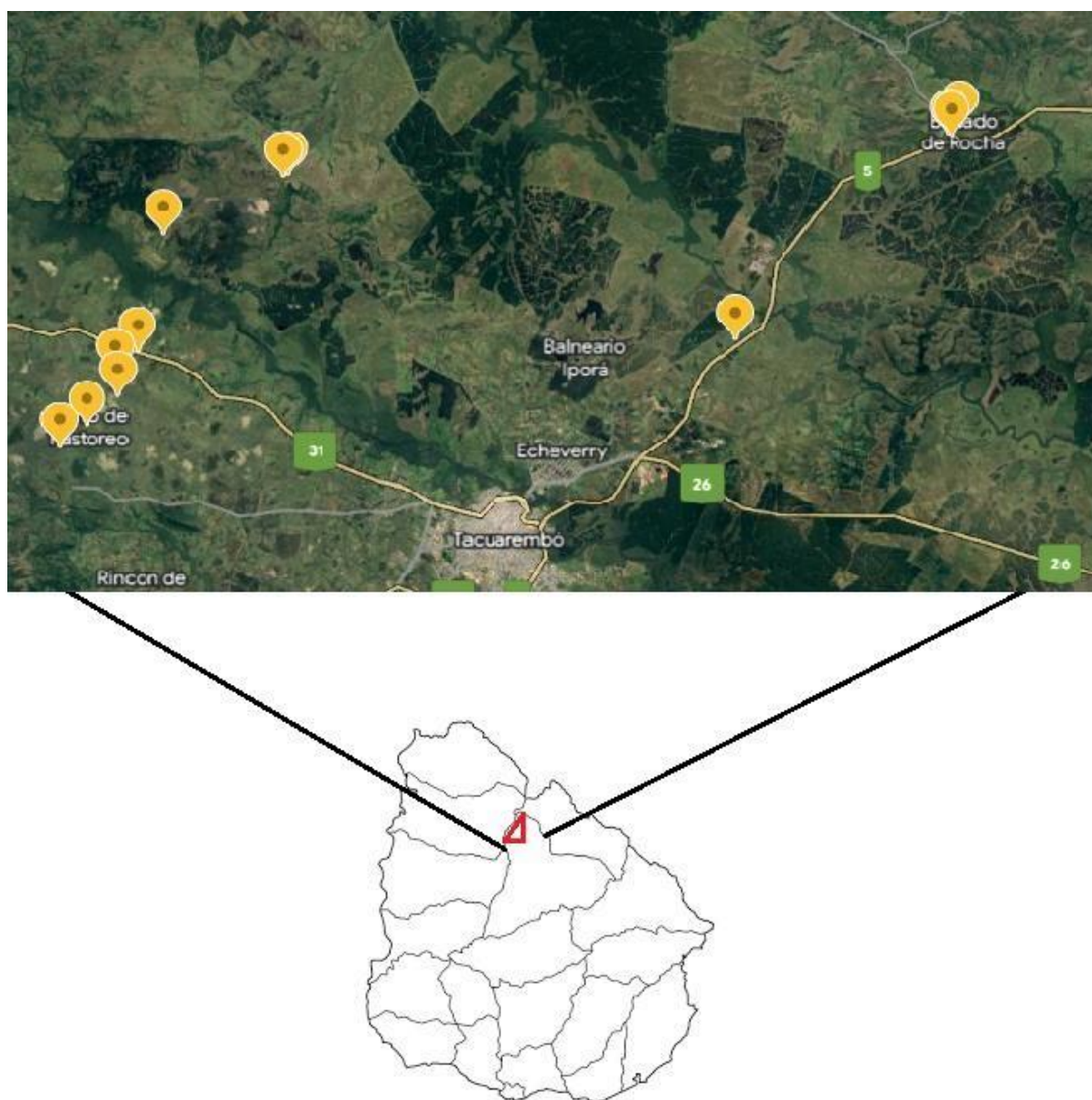
Se obtuvieron un total de 617 pulgas y la prevalencia general fue de 72,2% siendo la más alta para el departamento de Rivera con 80,88% y las más baja en Tacuarembó con 66,67% (Tabla 2).



**Figura 8:** Muestreo en el departamento de Artigas (modificado de Google Earth). Triangulo rojo: zona de muestreo, marcador amarillo: sitios con perros positivos.



**Figura 9:** Muestreo en el departamento de Rivera (modificado de Google Earth). Triangulo rojo: zona de muestreo, marcador amarillo: sitios con perros positivos.



**Figura 10:** Muestreo en el departamento de Tacuarembó (modificado de Google Earth). Triangulo rojo: zona de muestreo, marcador amarillo: sitios con perros positivos.

**Tabla 2.** Prevalencia de pulgas en perros de zonas rurales para los tres departamentos.

Perros	Artigas	Rivera	Tacuarembó	Total
Total	52	68	60	180
Positivos a pulgas	35	55	40	130
Negativos a pulgas	17	13	20	50
Prevalencia (%)	67,3	80,9	66,7	72,2
Intervalo de confianza al 95%	54,6-80,0	71,6-90,2	54,8-78,6	65,7-78,7

Además de la prevalencia, la intensidad y la abundancia media también resultó ser más baja en Tacuarembó (Tabla 3).

**Tabla 3.** Intensidad y abundancia media de pulgas en perros de zonas rurales para los tres departamentos.

	Artigas	Rivera	Tacuarembó	Total
<b>Intensidad media</b>				
<b>N° Pulgas / Perros</b>				
<b>Parasitados</b>	5,3 (186/35)	5,1 (283/55)	3,7 (148/40)	4,7 (617/130)
<b>Abundancia media</b>				
<b>N° Pulgas / Perros</b>				
<b>Examinados</b>	3,5 (186/52)	4,1 (283/68)	2,4 (148/60)	3,4 (617/180)

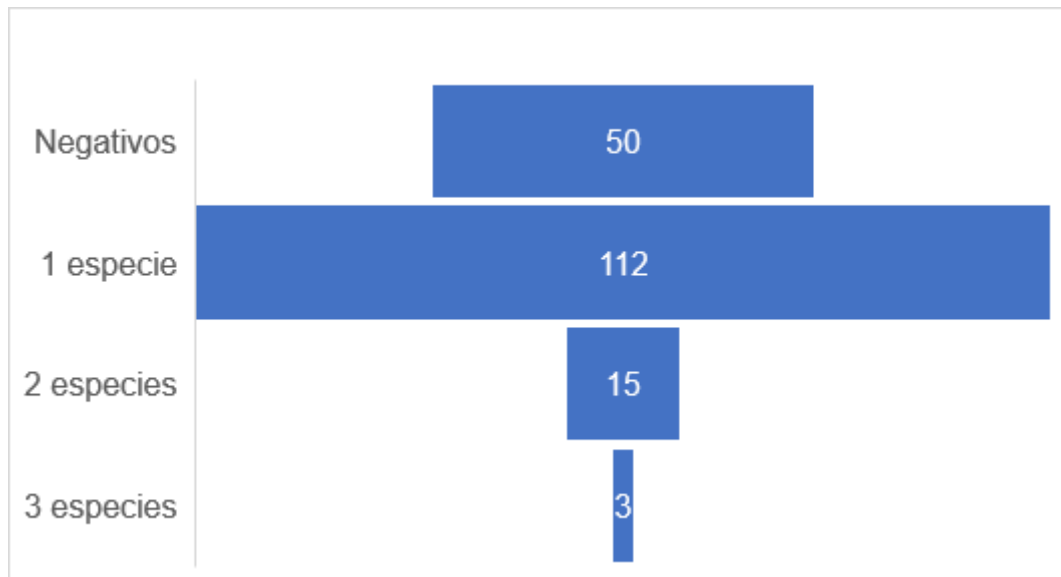
Morfológicamente se identificaron dos géneros de pulgas, *Ctenocephalides* y *Pulex*, representados por dos especies el primero, *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis* y por *Pulex irritans* el restante. Tanto *C. felis* como *C. canis* fueron halladas en perros rurales de los tres departamentos, en cambio *P. irritans* solamente en Rivera y Tacuarembó (Tabla 4).

**Tabla 4.** Especies, número y sexo de las pulgas halladas en perros para cada departamento.

Especie de pulga	<i>C. felis</i>		<i>C. canis</i>		<i>P. irritans</i>	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<b>Departamento</b>						
Artigas	138	47	1	0	0	0
Rivera	205	48	13	2	8	7
Tacuarembó	102	25	2	0	9	10
<b>Total</b>	<b>445</b>	<b>120</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>17</b>

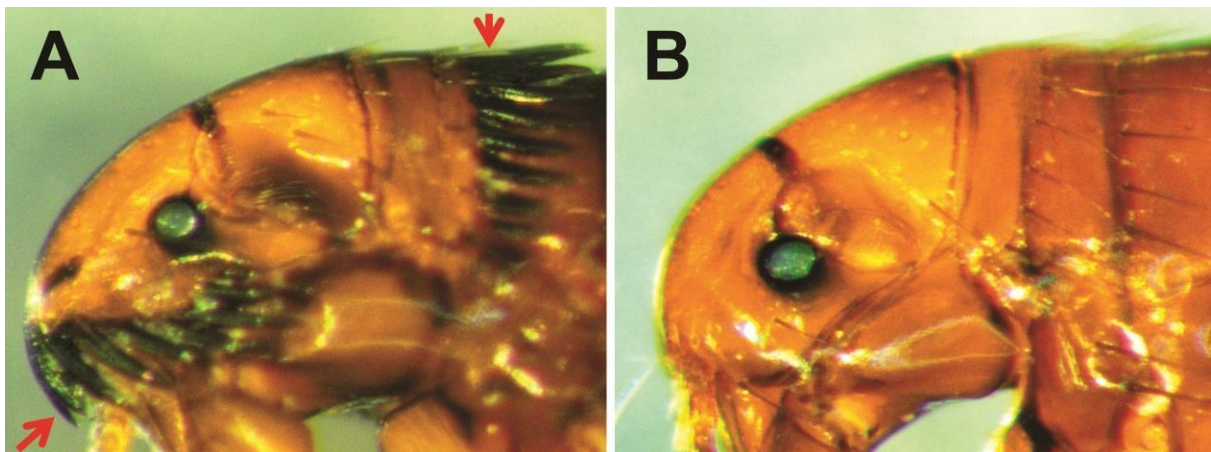
♀: hembra, ♂: macho

Además, se observaron 18 infecciones múltiespecíficas (Figura 11), es decir, perros que presentaron más de una especie de pulga. De ellas, una pertenecía a Artigas, 12 a Rivera y cinco a Tacuarembó. Del total de estas infecciones múltiples, 15 fueron con dos especies (seis con *C. canis* - *C. felis* y nueve con *C. felis* - *P. irritans*) y tres con las tres especies de pulgas (*C. canis*, *C. felis* y *P. irritans*).



**Figura 11:** Frecuencia de perros negativos e infectados con distintas especies de pulgas.

Para el reconocimiento morfológico a nivel de género, la principal diferencia fue la presencia de ctenidios, el ctenidio genal que se encuentra en posición horizontal en el margen ventral de la cabeza y el ctenidio pronotal, de posición vertical en la parte posterior del pronoto en el género *Ctenocephalides*. El género *Pulex* presenta cabeza redondeada desprovista de ctenidios genal y pronotal (Guimarães et al., 2001). En la figura 12 se muestran las diferencias más relevantes entre *Ctenocephalides* (Figura 12A) y *Pulex* (Figura 12B).

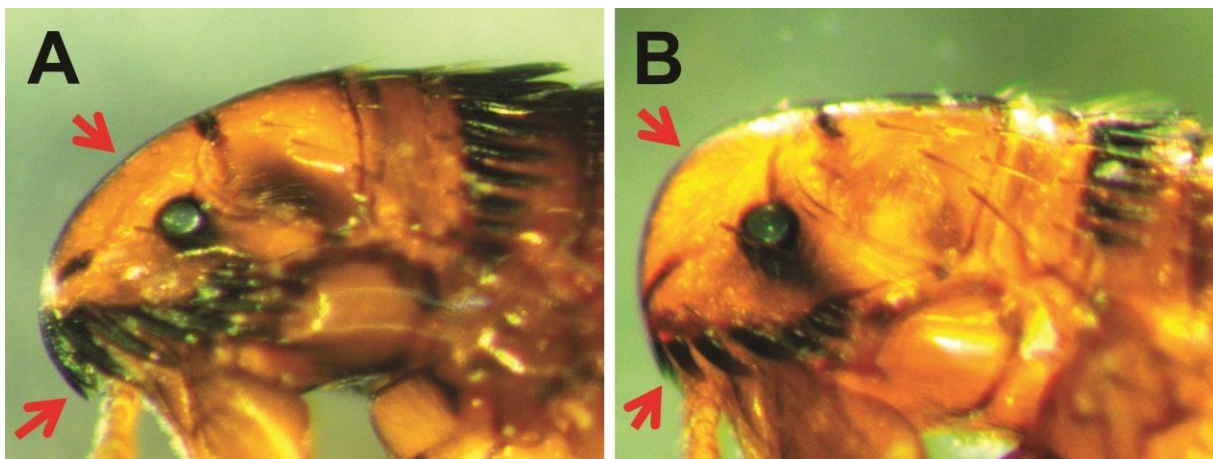


**Figura 12:** Diferencias morfológicas entre los géneros *Ctenocephalides* y *Pulex*. Las flechas rojas indican la presencia de ctenidio genal y ctenidio pronotal en *Ctenocephalides* (A) y la ausencia de ambos en *Pulex* (B).

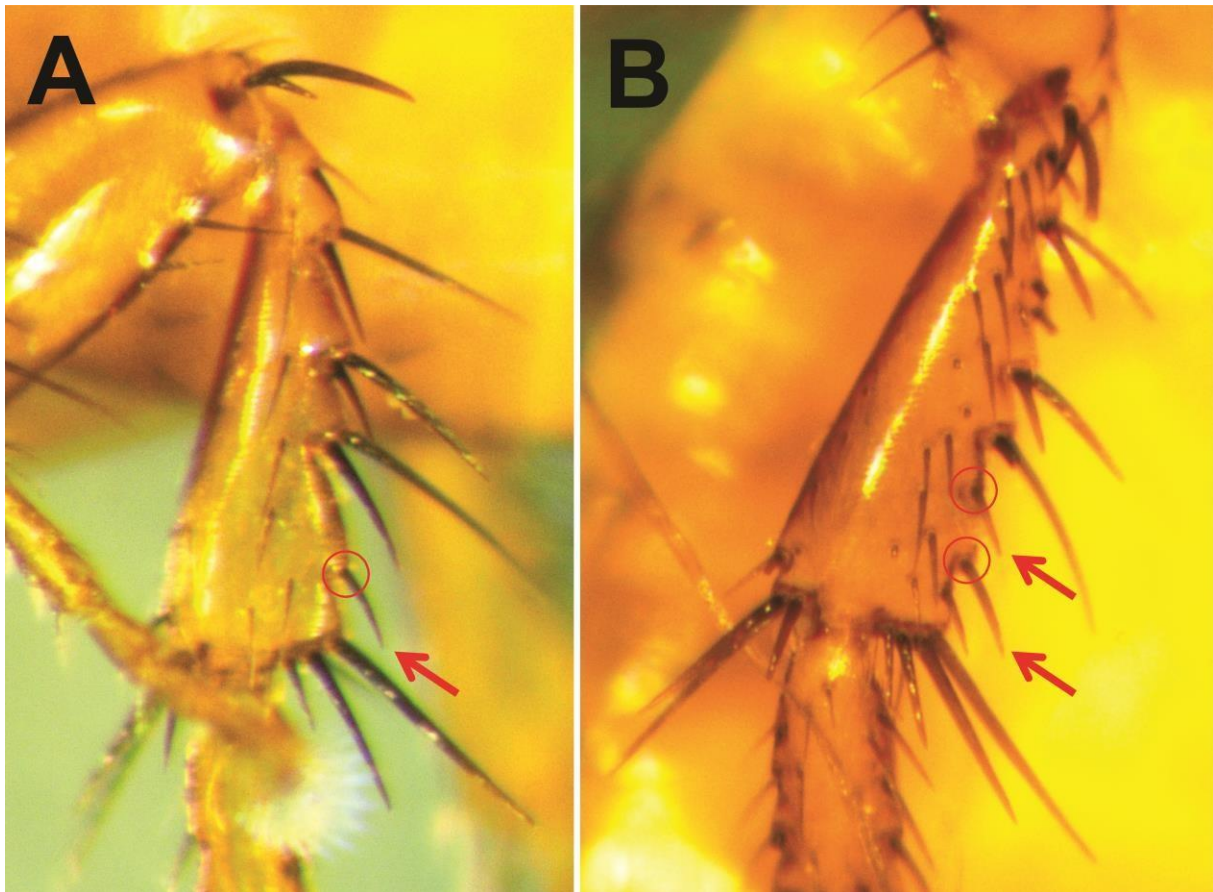
En cuanto a las especies, para diferenciar morfológicamente *C. felis* de *C. canis* se tomaron en cuenta tres caracteres: el perfil de la cabeza (Figura 13), el tamaño del primer diente del ctenidio genal (Figura 13) y las setas de la tibia del tercer par de



patas (Figura 14). Los ejemplares clasificados como *C. felis* presentaron la cabeza oblicua, alargada y con los dientes del ctenidio genal (15 a 18) de igual longitud (Figura 13A). En la parte posterior de la tibia del tercer par de patas presenta una sola seta entre las setas apicales y medianas (Figura 14B). En cambio, los ejemplares de *C. canis*, poseen la cabeza marcadamente más redondeada, con aspecto alto y corto, en el margen ventral de la cabeza posee de siete a ocho dientes en el ctenidio genal, de los cuales el primero es marcadamente más corto (Figura 13A), mientras que en la parte posterior de la tibia del tercer par de patas presenta una serie de setas, de las cuales se destacan dos entre las setas apical y medianas. (Figura 14B) (Guimarães et al., 2001; Linardi y Guimarães, 2000; Linardi y Santos 2012).



**Figura 13:** Diferencias morfológicas de la cabeza de *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis*. A: Cabeza de *Ctenocephalides felis*. B: Cabeza de *Ctenocephalides canis*. Flechas rojas indican primer diente de ctenidio genal y perfil de cabeza para ambas figuras.



**Figura 14:** Diferencias morfológicas de la tibia del tercer par de patas de *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis*. A: Tibia de *Ctenocephalides felis*. Flecha y círculo rojo indican seta tibial. B: Tibia de *Ctenocephalides canis*. Flechas y círculos rojos indican setas tibiales.

Por su parte *P. irritans*, además de las características genéricas mencionadas anteriormente, en la cabeza posee una cerda pre ocular y otra genal, así como una cerda larga en la región post antenal. Presenta un grupo de 10 o más cerdas espiniformes dispuestas en forma irregular en la cara interna de la coxa posterior (Guimarães et al., 2001).

En cuanto a los índices poblacionales para cada especie de pulga por cada departamento, la especie más prevalente y con mayores índices de intensidad y abundancia media en todos los departamentos fue *C. felis*, seguida por *P. irritans* y *C. canis*. El departamento con mayor prevalencia para las tres especies de pulgas fue Rivera (Tablas 5, 6 y 7).

**Tabla 5.** Índices poblacionales de *C. felis* por departamento.

<i>C. felis</i>	Artigas	Rivera	Tacuarembó	Total
Prevalencia %	67,3 (35/52)	80,9 (55/68)	65,0 (39/60)	71,7 (129/180)
Intervalo de confianza al 95%	54,5-80,0	71,6-90,2	52,9-77,0	65,1-78,2
Intensidad	5,3 (185/35)	4,6 (253/55)	3,3 (127/39)	4,4 (565/129)
Abundancia	3,6 (185/51)	3,7 (253/68)	2,1 (127/60)	3,1 (565/180)

**Tabla 6.** Índices poblacionales de *C. canis* por departamento.

<i>C. canis</i>	Artigas	Rivera	Tacuarembó	Total
Prevalencia %	1,9 (1/52)	10,3 (7/68)	1,7 (1/60)	5,0 (9/180)
Intervalo de confianza al 95%	*	3,1-17,5	*	1,8-8,2
Intensidad	1 (1/1)	2,1 (15/7)	2 (2/1)	2 (18/9)
Abundancia	0,02 (1/52)	0,2 (15/68)	0,03 (2/60)	0,1 (18/180)

\* No se cumple asunción de normalidad ( $np < 5$ ).

**Tabla 7.** Índices poblacionales de *P. irritans* por departamento.

<i>P. irritans</i>	Artigas	Rivera	Tacuarembó	Total
Prevalencia %	0 (0/52)	10,3 (7/68)	10,0 (6/60)	7,2 (13/180)
Intervalo de confianza al 95%	-	3,1-17,5	2,4-17,6	3,4-11,0
Intensidad	0 (0/0)	2,1 (15/7)	3,2 (19/6)	2,6 (34/13)
Abundancia	0 (0/52)	0,2 (15/68)	0,3 (19/60)	0,2 (34/180)

Para la extracción de ADN y amplificación del gen *cox1* mediante PCR, se seleccionaron 14 ejemplares, teniendo en cuenta que correspondieran en lo posible a una hembra y un macho de cada especie por departamento, como se detalla a continuación en la tabla 8.

**Tabla 8.** Pulgas seleccionadas para la extracción de ADN y amplificación mediante PCR de un fragmento del gen *cox1*.

Código / Muestra	Especie de pulga	Sexo	Departamento	Concentración de ADN (ng/μl)
P1 / 10	<i>C. felis</i>	Hembra	Artigas	7,4
P2 / 10	<i>C. felis</i>	Macho	Artigas	2,8
P3 / 10	<i>C. canis</i>	Hembra	Artigas	3,6

P4 / 97	<i>P. irritans</i>	Hembra	Rivera	9,5
P5 / 97	<i>P. irritans</i>	Macho	Rivera	2,2
P6 / 97	<i>C. felis</i>	Macho	Rivera	2
P7 / 97	<i>C. felis</i>	Hembra	Rivera	7,4
P8 / 59	<i>C. canis</i>	Macho	Rivera	3,2
P9 / 59	<i>C. canis</i>	Hembra	Rivera	7,7
P10 / 164	<i>C. felis</i>	Macho	Tacuarembó	1,8
P11 / 164	<i>C. felis</i>	Hembra	Tacuarembó	2,8
P12 / 164	<i>P. irritans</i>	Macho	Tacuarembó	1,6
P13 / 165	<i>P. irritans</i>	Hembra	Tacuarembó	7,1
P14 / 164	<i>C. canis</i>	Hembra	Tacuarembó	3,7

En la extracción de ADN se obtuvieron resultados con concentraciones de ADN de 1,6 a 9,5 ng/μl (Tabla 8).

Luego de la extracción de ADN se les realizaron a las 14 muestras los dos protocolos de PCRs anteriormente descriptos (Tabla 9).

Con los cebadores LCO1490/HCO2198 y las condiciones de Lawrence et al. (2015) no hubo amplificación de ADN en ninguna muestra (Tabla 9) (Figura 15B). Para los mismos cebadores pero con las condiciones de Zurita et al. (2019) obtuvimos nueve muestras que amplificaron ADN (P3, P4, P5, P7, P8, P9, P12, P13, P14) (Tabla 9) (Figura 15A).

Con los cebadores LCO 1490/Cff-R y las condiciones de Zhang et al. (2022) no hubo amplificación de ADN (Figura 16B) y con las condiciones de Zurita et al. (2019) observamos amplificación de ADN en tres muestras (P2, P6, P11) (Tabla 9) (Figura 16A).

Por lo tanto, con las diferentes combinaciones de protocolos y condiciones se obtuvieron amplificaciones de ADN en 12 de las 14 muestras seleccionadas. Únicamente las muestra P1: *C. felis* hembra de Artigas y P10: *C. felis* macho de Tacuarembó no amplificaron para ninguno de los protocolos y condiciones (Tabla 9). Todos los productos de PCR que evidenciaron amplificación de ADN (positivos) fueron enviados a secuenciar.

PCR citocromo c oxidasa subunidad I (cytochrome c oxidase I - COI / cox1)  
 LCO1490 - HCO2198 (Folmer et al., 1994)  
 Pulgas Perros Noreste Uruguay (PUL1-14)

15A

28/9/2022



PCR settings PULGAS: Zurita et al. 2019  
 (Folmer et al. 1994)

Paso	Tiempo	T [°C]	Ciclos
Initialisation	2 min	96	
Denaturation	30 sec	94	40 cycles
Annealing	30 sec	50	
Elongation	60 sec	72	
Final Extension	7 min	72	

M : marcador de peso molecular  
 C+ : Paramphistomum  
 C- : control negativo



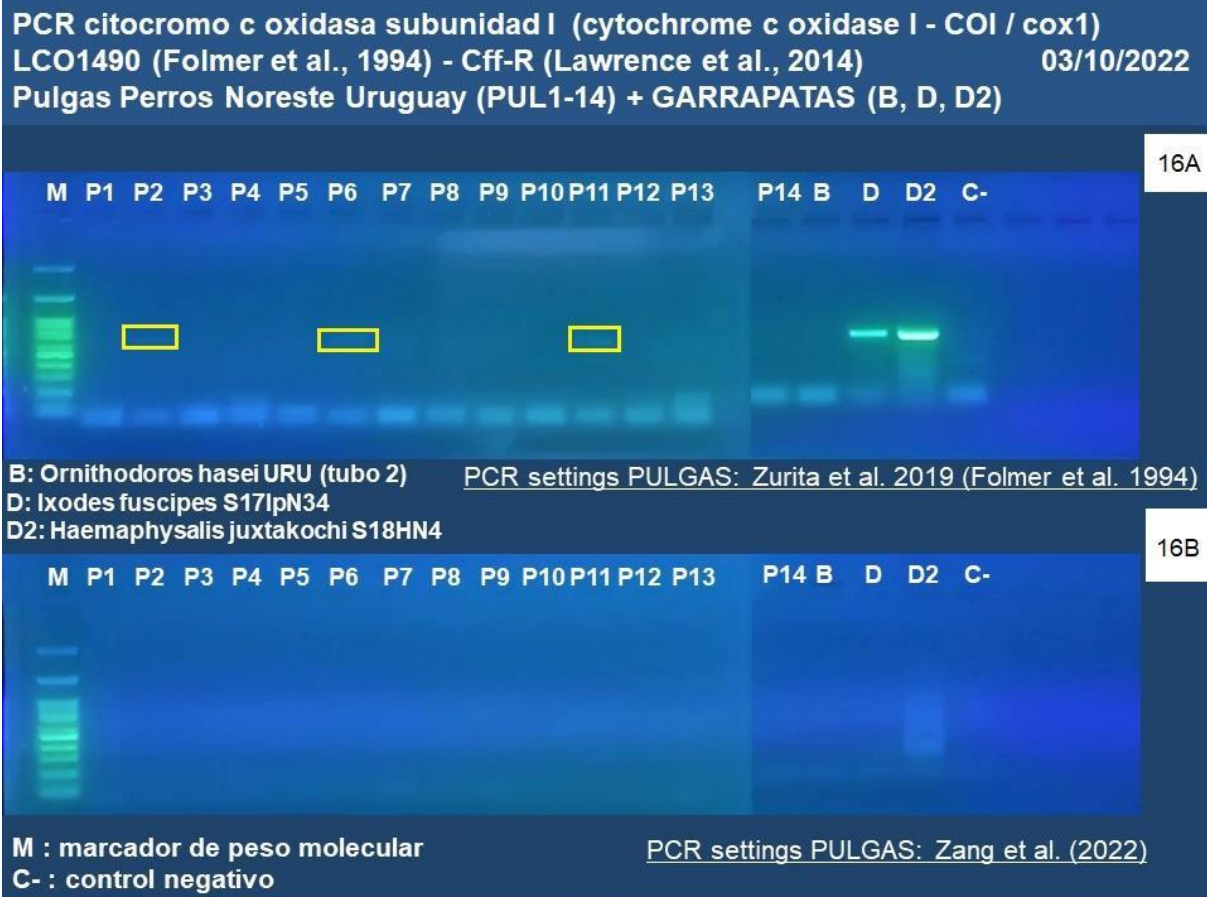
15B

PCR settings PULGAS: Lawrence et al. 2015

Paso	Tiempo	T [°C]	Ciclos
Initialisation	1 min	95	
Denaturation	15 seg	95	35 cycles
Annealing	15 sec	55	
Elongation	10 sec	72	
Final Extension	5 min	72	

M : marcador de peso molecular  
 C+ : Paramphistomum  
 C- : control negativo

**Figura 15:** Gel de la corrida de electroforesis del protocolo Folmer et al. (1994), condiciones de Zurita et al. (2019) (15A) y Lawrence et al. (2015) (15B).



**Figura 16:** Gel de la corrida de electroforesis del protocolo de Lawrence et al. (2014), condiciones de Zurita et al. (2019) Muestras positivas marcadas con un rectángulo amarillo debido a que están tenues (16A) y Zhang et al. (2022) (16B).

**Tabla 9:** Pulgas procesadas mediante PCR para amplificar un fragmento del gen *cox1* y muestras enviadas a secuenciar.

Código / Muestra	Especie por sexo	Resultados				Muestras enviadas a secuenciar
		Zurita et al. (2019)	Lawrence et al. (2015)	Zhang et al. (2022)		
P1 / 10	<i>C. felis</i> Hembra	-	-	-	-	NO
P2 / 10	<i>C. felis</i> Macho	-	+	-	-	SI
P3 / 10	<i>C. canis</i> Hembra	+	-	-	-	SI
P4 / 97	<i>P. irritans</i> Hembra	+	-	-	-	SI
P5 / 97	<i>P. irritans</i> Macho	+	-	-	-	SI
P6 / 97	<i>C. felis</i> Macho	-	+	-	-	SI
P7 / 97	<i>C. felis</i> Hembra	+	-	-	-	SI
P8 / 59	<i>C. canis</i> Macho	+	-	-	-	SI
P9 / 59	<i>C. canis</i>	+	-	-	-	SI

	Hembra						
P10 / 164	<i>C. felis</i> Macho	-	-	-	-		NO
P11 / 164	<i>C. felis</i> Hembra	-	+	-	-		SI
P12 / 164	<i>P. irritans</i> Macho	+	-	-	-		SI
P13 / 165	<i>P. irritans</i> Hembra	+	-	+	-		SI
P14 / 164	<i>C. canis</i> Hembra	+	-	+	-		SI

---

+ (Positivo) / - (Negativo)



De las 12 muestras enviadas a secuenciar se obtuvieron nueve secuencias que correspondieron a pulgas (Tabla 10) y tres a *Wolbachia* sp. (bacterias endosimbiontes de artrópodos). A excepción de la muestra P7: *C. felis* hembra de Rivera, cuya secuencia resultó de baja calidad y no pudo ser alineada, las restantes ocho secuencias demostraron tener una identidad nucleotídica con secuencias de *C.felis*, *C. canis* y *P. irritans* depositadas en el GenBank, que se corresponden con la identificación morfológica (Tabla 10).

**Tabla 10:** Secuencias obtenidas y porcentaje de identidad.

Códigos	Muestra	Especie por morfología y sexo	Departamento	Tamaño de la secuencia (pb)	% de identidad (pb/pb) - especie - país (N° GenBank)
P2	10	<i>C. felis</i> Macho	Artigas	631	100% (601/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - Seychelles (KF684872); 99,83% (600/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - Seychelles (KF684875, KF684876); 99,83% (600/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - República Centrafricana (MG586492)
P3	10	<i>C. canis</i> Hembra	Artigas	536	98,51% (528/536) - <i>Wolbachia</i> endosimbionte (LR799305)
P4	97	<i>P. irritans</i> Hembra	Rivera	693	100% (670/670) - <i>Pulex irritans</i> - Irán (MN173761); 100% (658/658) - <i>Pulex irritans</i> - España (LT797470); 100% (600/600) - <i>Pulex irritans</i> - Israel (MW136217); 100% (659/569) - <i>Pulex irritans</i> - China (ON406184)
P5	97	<i>P. irritans</i> Macho	Rivera	693	100% (670/670) - <i>Pulex irritans</i> - Irán (MN173761); 100% (658/658) - <i>Pulex irritans</i> - España (LT797470); 100% (600/600) - <i>Pulex irritans</i> - Israel (MW136217); 100% (659/569) - <i>Pulex irritans</i> - China (ON406184)

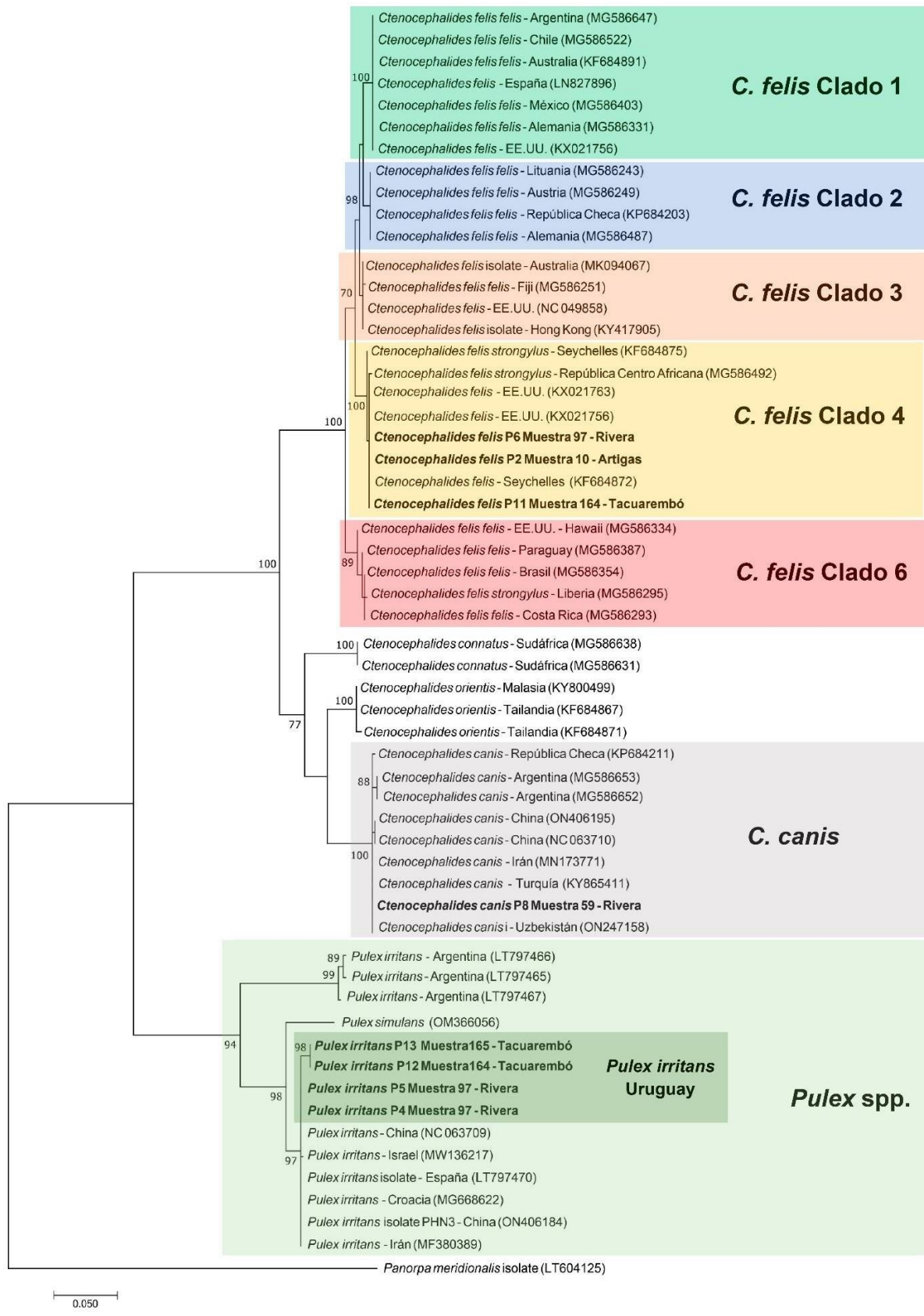
P6	97	<i>C. felis</i> Macho	Rivera	641	100% (601/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - Seychelles (KF684872); 99,83% (600/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - Seychelles (KF684875, KF684876); 99,83% (600/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - República Centroafricana (MG586492)
P7	97	<i>C. felis</i> Hembra	Rivera		Secuencia de baja calidad.
P8	59	<i>C. canis</i> Macho	Rivera	566	100% (566/566) - <i>Ctenocephalides canis</i> - Irán (MN173762-MN173771); 100% (566/566) - <i>Ctenocephalides canis</i> - Turquía (KY865410-KY865411); 100% (566/566) - <i>Ctenocephalides canis</i> - República Checa (KP684209-KP684210); 100% (566/566) - <i>Ctenocephalides canis</i> - República Checa (MW136243); 100% (560/560) - <i>Ctenocephalides canis</i> - Lituania (MW136244); 100% (513/513) - <i>Ctenocephalides canis</i> - República de Uzbekistán (MW136244)
P9	59	<i>C. canis</i> Hembra	Rivera	581	97,25% (565/581) - <i>Wolbachia</i> endosimbionte (LR798833)
P11	164	<i>C. felis</i> Hembra	Tacuarembó	641	100% (601/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - Seychelles (KF684872); 99,83%

					(600/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - Seychelles (KF684875, KF684876); 99,83% (600/601) - <i>Ctenocephalides felis strongylus</i> - República Centroafricana (MG586492)
P12	164	<i>P. irritans</i> Macho	Tacuarembó	669	99,33% (592/596) - <i>Pulex irritans</i> - Israel (MW136217); 99,32% (588/592) - <i>Pulex irritans</i> - Irán (MF380389); 99,30% (565/569) - <i>Pulex irritans</i> - China (ON406184)
P13	165	<i>P. irritans</i> Hembra	Tacuarembó	693	99,33% (596/600) - <i>Pulex irritans</i> - Israel (MW136217); 99,32% (593/597) - <i>Pulex irritans</i> - Irán (MF380389); 99,30% (565/569) - <i>Pulex irritans</i> - China (ON406184)
P14	164	<i>C. canis</i> Hembra	Tacuarembó	602	98,53% (538/546) - <i>Wolbachia</i> endosimbionte (LR799305)

En el análisis filogenético, la única secuencia de *C. canis* obtenida, que corresponde a un macho procedente de Rivera (P8), se integra en un clado con un soporte del 100% con secuencias de *C. canis* de diferentes partes del mundo, incluidas secuencias de Argentina, Europa y Asia (Figura 17).

Las secuencias obtenidas de *C. felis*, correspondientes a las muestras Artigas (P2), Rivera (P6) y Tacuarembó (P11) se integran con un soporte del 100% al denominado clado 4 de *C. felis* citado por Lawrence et al. (2019), clado que a su vez es incluido al grupo tropical 1 por los mismos autores. En el clado 4, se encuentran secuencias de ejemplares de Seychelles, República Centro Africana y EE.UU. En la tabla suplementaria de Lawrence et al. (2019) donde se encuentran todas las secuencias de *C. felis* utilizadas para el estudio, no se reporta ninguna para la región, siendo incluso la única para América la de EE.UU. (Figura 17).

En el caso de *P. irritans* las secuencias de los ejemplares de Rivera (P4 y P5) y Tacuarembó (P12 y P13) se agrupan con secuencias de Europa (España y Croacia) y Asia (Irán y China) (Figura 17) y se separan del clado generado por las secuencias de *P. irritans* disponibles de Argentina, similar a lo demostrado por Zurita et al. (2019).



**Figura 17:** Árbol filogenético construido con secuencias parciales del gen *cox-1* mediante el método de máxima verosimilitud de acuerdo al modelo Tamura 3 parámetros. Los números representan el soporte *bootstrap* generado a partir de 1000 réplicas, se muestran los valores >70. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrita. Los números de acceso a GenBank están entre paréntesis. *Panorpa meridionalis* fue incluido como grupo externo.

## 6. DISCUSIÓN

Para Uruguay las principales pulgas de importancia médica y veterinaria reportadas son *C. felis*, *C. canis*, *P. irritans*, *X. cheopis* y *T. penetrans*. Exceptuando a *X. cheopis* asociada a roedores y que en Uruguay fue estudiada en ratas de Montevideo debido a los brotes de peste bubónica hasta 1932 (Gaminara, 1929; Vanni, 1947; Cabrera, 1982) y *T. penetrans* de la cual se han observado casos esporádicos en humanos en el norte del país en la frontera con Brasil (Cabrera, 1982; Conti-Díaz, 1999), las otras tres especies restantes se asocian a carnívoros, aunque también pueden afectar al hombre.

Si bien las pulgas son frecuentes en perros en nuestro país, la bibliografía que las documenta es escasa o en determinados casos es confusa, como se discutirá más adelante para cada especie.

En este trabajo se identificaron tres especies de pulgas en perros rurales del noreste del país, *C. felis* y *C. canis* en los tres departamentos estudiados y *P. irritans* en Rivera y Tacuarembó.

Los reportes documentados de *C. felis* para perros en Uruguay son relativamente recientes, ya que en Castro y Trenchi (1955) se la menciona para bovino, gato montés y comadreja. Las primeras citas para perros y gatos corresponderían a Venzal et al. (2006) y Castro et al. (2013) respectivamente.

En el caso de *C. canis*, cuenta con registros en perros, entre ellos los de Carballo Pou, Viera, Calzada y Rodríguez García (1938), Venzal et al. (2006) y Carballal Pereira y Galliazzi Cavalheiro (2015).

En cambio, para *P. irritans* no existe una cita formal para perros, incluso en Castro y Trenchi (1955) donde se menciona como hospedador al humano citando a Gaminara (1929), se estudian los índices pulex y cheopis en pulgas de ratas de Montevideo en relación con la peste bubónica y no se determina a ninguna pulga como *P. irritans*. Por lo que estos serían los primeros reportes documentados de *P. irritans* para perros en el país.

A excepción del estudio de Carballal Pereira y Galliazzi Cavalheiro (2015), tampoco existen trabajos sobre prevalencia y otros índices poblacionales de pulgas en perros en Uruguay.

En nuestro estudio se obtuvo una prevalencia general de pulgas en perros de 72,2%, algo más alta a la obtenida por Carballal Pereira y Galliazzi Cavalheiro (2015) que fue de 61,48% en perros en la ciudad de Bella Unión, al noroeste del Departamento de Artigas, quienes hallaron *C. felis* y *C. canis*. La prevalencia de *C.*

*felis* fue de 57,42%, siendo menor a lo registrado en este trabajo para dicha especie que fue de 71,7%, mientras que para *C. canis* fue de 0,80% que también resultó menor al registro de nuestro estudio que fue de 5%.

A nivel regional, en Argentina, en cinco localidades de la Provincia de Buenos Aires, González, Castro y González (2004) hallaron únicamente *C. canis* en perros con una prevalencia de 15,7%. Estos datos contrastan con un reciente trabajo de Urdapilleta et al. (2022) en perros de la Provincia de Misiones, donde únicamente determinan a *C. felis* con prevalencia de 79,8%, intensidad media de 5,44.

Nuestros datos difieren con los de ambos trabajos en la composición de las especies de pulgas y los índices poblacionales. Nuestra prevalencia para *C. canis* fue menor, y el en caso de *C. felis* un poco menor.

En cuanto a la intensidad media, nuestro dato fue menor que al hallado por Urdapilleta et al. (2022), siendo de 4,7.

En Chile, Alcaíno, Gorman y Alcaíno (2002) estudiando pulgas de perros en tres ciudades, obtuvieron una prevalencia de 41,8% para *C. felis*, 39,4% para *C. canis* y 18% para *P. irritans*. En este trabajo si bien encuentran las mismas especies de pulgas que en nuestro estudio, las prevalencias son más altas para *C. canis* y *P. irritans*, y más baja para *C. felis*. Pero esto cambia si solo tomamos en cuenta la ciudad de Santiago de Chile, donde los autores reportan una prevalencia de 80,5% para *C. felis*, la cual se asemeja más a la del noreste de Uruguay.

En Brasil, en el Estado de Minas Gerais, en los trabajos llevados a cabo por Costa et al. (2012) y Linardi y Nagem (1973) se identifican las mismas especies de pulgas que las de nuestro estudio. Costa et al. (2012) analizaron los índices poblacionales de ectoparásitos en épocas secas y lluviosas en las ciudades de Lavras y Nanuque, obteniendo resultados de prevalencia para pulgas de 80,4% en Lavras en época seca y 87,7% en época lluviosa y para Nanuque de 68,6 y 43,9% respectivamente para cada época. Respecto a cada especie, la prevalencia para *C. felis* fue de 80,4% en época seca y 87,3% en época lluviosa y para *P. irritans* de 1,1% y 1,4% respectivamente para cada época en la ciudad de Lavras. Mientras que en la ciudad de Nanuque la prevalencia para *C. felis* fue de 68,6% en época seca y 43,9% en época lluviosa y para *P. irritans* de 6,9% y 0% respectivamente para cada época. En el caso de *C. canis* se registró únicamente en la época lluviosa siendo la prevalencia de 5,6% en Lavras y 4,5% para Nanuque. En el trabajo de Linardi y Nagem (1973) la prevalencia fue de 87,23% para *C. felis*, 3,19% para *C. canis* y 60,28% para *P. irritans*. La prevalencia obtenida en nuestro trabajo fue menor a la obtenida por Costa et al. (2012) en la ciudad de Lavras aunque superior a la de la ciudad de Nanuque en la época lluviosa.

Comparando nuestras prevalencias por especie con las de Linardi y Nagem (1973) observamos que resultaron ser inferiores para *C. felis* y principalmente para *P. irritans*, pero ligeramente superior para *C. canis*.

Respecto al trabajo de Costa et al. (2012) en la ciudad de Lavra, nuestra prevalencia resultó inferior para *C. felis* y superior para *P. irritans* en las épocas seca y lluviosa, mientras que *C. canis* se registró solo en la época lluviosa siendo levemente superior a nuestra prevalencia. En la ciudad de Nanuque la prevalencia fue inferior



para *C. felis* en época seca y más aún en la lluviosa, la prevalencia de *P. irritans* fue superior en la época seca y no se registró en época lluviosa, en cambio, la prevalencia para *C. canis* fue inferior y solo se registró en época lluviosa.

Por lo tanto, en los trabajos llevados a cabo a nivel regional, y si bien en todos ellos no se hallan las tres especies de pulgas, la especie más prevalente es *C. felis*, seguida por *P. irritans* y *C. canis*, con valores siempre menores, a excepción del estudio de González et al. (2004) donde solo se determina a *C. canis* para la Provincia de Buenos Aires en Argentina.

En cuanto a los estudios moleculares para la identificación a nivel específico de las pulgas, no existen trabajos que involucren a pulgas de nuestro país, al menos para las especies que parasitan carnívoros. Esto es llamativo ya que Lawrence et al. (2019) analizan varias especies de pulgas de países de la región como Argentina, Brasil, Chile y Paraguay, obteniendo secuencias de los genes *cox1* y *cox2*.

Por lo que las secuencias obtenidas en este estudio para el gen *cox1* para *C. felis*, *C. canis* y *P. irritans* son las primeras para Uruguay, lo cual además confirma que los diagnósticos morfológicos coinciden con los genéticos.

En cuanto a los protocolos utilizados a través de diferentes combinaciones de cebadores para la amplificación de un fragmento del gen *cox1*, se observaron diferencias en las amplificaciones para cada especie de pulga.

Por ejemplo, en el caso de los cebadores HCO2198/LCO1490 que se utilizan para invertebrados en general (Folmer et al., 1994), de las 14 muestras utilizadas se amplificaron nueve muestras que correspondían a una *C. felis*, cuatro *C. canis* y cuatro *P. irritans*, siguiendo las condiciones de Zurita et al. (2019). En cambio, no se logró amplificar ninguna muestra con este mismo protocolo, pero con las condiciones de Lawrence et al. (2015).

Debido a que con el protocolo de (Folmer et al., 1994) solo se amplificó una muestra de las seis *C. felis* utilizadas, también se utilizó un protocolo propuesto por Lawrence et al. (2014) que combina el cebador LCO1490 de Folmer et al. (1994) con el Cff-R diseñado específicamente para este trabajo. Se procesaron las mismas 14 muestras que con el protocolo anterior utilizando las condiciones Zurita et al. (2019) y Zhang et al. (2022), logrando amplificar solo tres muestras, todas pertenecientes a *C. felis*, aunque con bandas muy tenues en el gel de agarosa y únicamente con las condiciones de Zurita et al. (2019).

Entre los dos protocolos se obtuvieron unas 12 amplificaciones, las cuales se purificaron y enviaron a secuenciar. De las nueve secuencias obtenidas con el protocolo de Folmer et al. (1994), la única secuencia de *C. felis* resultó de mala calidad y no pudo ser utilizada, de las cuatro *C. canis*, tres correspondieron a *Wolbachia* sp., una bacteria intracelular gramnegativa considerada un endosimbionte de los artrópodos, con una alta capacidad de alterar la variabilidad del ADNmt (Zurita Carrasco, 2018; Landmann, 2019) y solo una secuencia de buena calidad correspondiente a *C. canis*. En cambio, las cuatro secuencias obtenidas de *P. irritans* tuvieron un buen marco de lectura para la especie.

Las amplificaciones y posteriores secuencias inespecíficas en los trabajos de pulgas utilizando el protocolo de Folmer et al. (1994), y especialmente en el caso de *C. felis*,

es mencionado por Lawrence et al. (2014), por lo que crean y combinan diferentes cebadores.

En nuestro caso, a pesar de utilizar el mismo protocolo de Lawrence et al. (2014) e incluso dos condiciones de PCR diferentes, solo logramos obtener tres secuencias de buena calidad de *C. felis*.

En cuanto a la identidad de las secuencias, correspondieron entre 99,8 a 100% para *C. felis*, 100% para *C. canis* y 99,3 a 100% para *P. irritans* con las disponibles en el GenBank para diferentes regiones a nivel mundial.

Con respecto al análisis filogenético (Figura 16), la única secuencia obtenida de *C. canis* forma un clado con un 100% de soporte con secuencias obtenidas de diferentes partes del mundo, lo que coincide con Lawrence et al. (2019) quienes confirman la monofilia para este taxón.

En cambio, para *C. felis*, nuestras secuencias, que corresponden a un ejemplar para cada departamento, difieren con las secuencias de *C. felis* obtenidas para países de la región por Lawrence et al. (2019), quienes clasifican a *C. felis* en ocho clados dentro de cuatro grupos de acuerdo a su distribución: grupo Templado (clados 1 y 2), grupo Tropical I (clados 3 y 4), grupo Tropical II (clados 5 y 6) y grupo África (clados 7 y 8). Según Lawrence et al. (2019), en nuestra región se ha reportado el clado 1 (Templado) para *C. felis* de Argentina y Chile, y el clado 6 (Tropical II) para Brasil y Paraguay. Como se observa en el árbol filogenético, nuestras tres secuencias de *C. felis* se agrupan con secuencias de ejemplares del continente africano (Seychelles y República Centroafricana) y norteamericano (EE.UU.) en lo que se denomina clado 4 (Tropical I). Esto determina la presencia de un nuevo clado para *C. felis* en la región.

Para *C. felis*, desde un punto de vista morfológico, tradicionalmente se reconocían cuatro subespecies: la cosmopolita *Ctenocephalides felis felis*, la asiática *Ctenocephalides felis orientis* y dos subespecies restringidas al continente africano: *Ctenocephalides felis strongylus* y *Ctenocephalides felis damarensis*. Aunque posteriormente, *C. f. orientis* y *C. f. damarensis* fueron morfológicamente reclasificadas como especies válidas (Beaucournu y Menier, 1998; Lawrence et al., 2019). Esto es respaldado parcialmente en base a estudios moleculares mediante el gen *cox1* por Lawrence et al. (2019), quienes regresan a *C. damarensis* al estatus de subespecie junto a *C. f. felis* y *C. f. strongylus*. Aunque estos autores denominan como *C. f. "transicional"* a ejemplares de pulgas de África, que podrían tratarse de una hibridación entre ejemplares de *C. f. felis* y *C. f. strongylus*.

En el caso de nuestras muestras de *C. felis* y tomando en cuenta a Lawrence et al (2019), podrían tratarse de *C. f. "transicional"*, ya que las mismas se incluyen en el clado 4. Aunque para aseverar esto, serían necesarios más estudios morfológicos y moleculares.

Por otro parte, según el mapa de hábitats adecuados para la ocurrencia de especies de *Ctenocephalides* así como de los diferentes grupos de *C. felis* propuesto por Lawrence et al. (2019), la localización y condiciones bioclimáticas de Uruguay permitiría la presencia de ejemplares pertenecientes a los grupos Templado, Tropical I y II.

En el caso de *P. irritans*, las cuatro secuencias obtenidas se agrupan en el análisis filogenético en un clado con un soporte de 98% con ejemplares registrados en Europa (España y Croacia) y Asia (China, Israel e Irán). Lo cual difiere con la posición que ocupan ejemplares asignados a *P. irritans* provenientes de Argentina. Esto fue discutido por Zurita et al. (2019) quienes mencionan que los ejemplares de España y Argentina provienen de dos linajes correspondientes a orígenes geográficos diferentes. Nuestro árbol filogenético demuestra que otra especie de *Pulex*, *P. simulans*, es más próxima a nuestros ejemplares y los de Europa y Asia, que los provenientes de Argentina. Incluso, Zurita et al. (2019) sugieren que estos dos linajes genéticos geográficos diferentes podrían tratarse de especies crípticas, las que se discriminarían mediante métodos moleculares.

A pesar de que en nuestro estudio únicamente utilizamos secuencias del gen *cox1*, se demuestra claramente que en nuestra región se encontrarían los dos linajes de *P. irritans* mencionados por Zurita et al. (2019).

## 7. CONCLUSIONES

Se demuestra la presencia de *C. felis*, *C. canis* y *P. irritans* en perros rurales del noreste del país, siendo la primera determinación basada en la combinación de análisis morfológicos y moleculares para Uruguay.

La especie más prevalente y con mayor intensidad media resultó ser *C. felis* para los tres departamentos, lo cual coincide con un estudio anterior llevado a cabo en el noroeste del Departamento de Artigas.

Las secuencias para el gen *cox1* de *C. felis* del noreste del Uruguay indican que pertenecen al clado 4 del grupo Tropical I, siendo este el primer registro para América Latina de este grupo.

En base a las secuencias de *P. irritans* obtenidas en este estudio, se demuestra la presencia de dos especies crípticas del grupo, una presente en Argentina y la otra en Europa, Asia y Uruguay.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaíno, H.A., Gorman, T.R., y Alcaíno, R. (2002). Flea species from dogs in three cities of Chile. *Veterinary Parasitology*, 105(3), 261-5. doi:10.1016/s0304-4017(01)00626-4.
- Azrizal-Wahid, N., Sofian-Azirun, M., y Low, V.L. (2020). New insights into the haplotype diversity of the cosmopolitan cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Veterinary Parasitology*, 281, 109102. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109102>
- Bacot, A.W. (1914). A study of the bionomics of the common rat fleas and other species associated with human habitations, with special reference to the influence of temperature and humidity at various periods of the life history of the insect. *The Journal of Hygiene, Plague Supplement*, 3, 447-654.
- Beaucournu, J.C., y Launay, H. (1990). *Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental* (Faune de France, Vol. 76). Paris: Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles.
- Beaucournu, J.C., y Ménier, K. (1998). Le genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasite*, 5(1), 3-16. <https://doi.org/10.1051/parasite/1998051003>
- Blanco, J.R., y Raoult, D. (2005). Enfermedades producidas por *Bartonella spp.* *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(5), 313-320. <https://doi.org/10.1157/13074971>
- Bowman, D.D. (2011). *Georgis Parasitología para Veterinarios* (9ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Bowman, D.D. (2021). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (11<sup>th</sup> ed.). St. Louis: Elsevier.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., y Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83(4), 575-583.
- Cabrera, R. (1982). Afanipteros. En J.J. Osimani, *Parasitología Médica* (Vol. 2, pp. 821-837). Montevideo: Librería Médica.
- Carballal Pereira, P., y Galliazi Cavalheiro, R. (2015). *Estudio de ectoparásitos de carnívoros domésticos de importancia sanitaria en la ciudad de Bella Unión* (Tesis de Grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Carballo Pou, M., Viera, O., Calzada, V., y Rodríguez García, J.A. (1938). Primera comprobación de microfilarias del perro en el Uruguay. *Anales de la Facultad de Veterinaria* (Uruguay), 4, 355-358.
- Castro, E., y Trenchi, H. (1955). *Fauna parasitológica comprobada en el Uruguay y bibliografía parasitológica nacional*. Pando: Laboratorio de Biología Animal "Dr. Miguel C. Rubino".
- Castro, O., Valledor, S., Crampet, A., y Casás, G. (2013). Aporte al conocimiento de los metazoos parásitos del gato doméstico en el Departamento de Montevideo, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 49(190), 28-37.

- Conti Díaz, I.A. (1999). Ectoparasitosis humana: estado actual en Uruguay. *Boletín Chileno de Parasitología*, 54(3-4), 101-103. <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-94021999000300011>
- Costa-Junior, L.M., Rembeck, K., Mendonça, F.L., Azevedo, S.C., Passos, L.M., y Ribeiro, M.F. (2012). Occurrence of ectoparasites on dogs in rural regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria*, 21(3), 237-242. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000300011>
- Cunha, R.A. (1914). *Contribuição para o estudo dos sifonapteros do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Rodríguez & Cía.
- Daniel, W.W. (1998). Bioestadística. *Base Para el Análisis de las Ciencias de la Salud* (3ª ed.). México: UTEHA Noriega editores.
- Durden, L.A., y Traub. R. (2002). Fleas (Siphonaptera). En G.R. Mullen y L.A. Durden, *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 103-125). Cambridge: Academic Press.
- Durden, L.A., y Hinkle, N.C. (2019). Fleas (Siphonaptera). En G.R. Mullen y L.A. Durden, *Medical and Veterinary Entomology* (3rd pp. 145-169). Cambridge: Academic Press.
- Faccini, Á.A., Forero, E.G., Cortés, J.A., Polo, L.J., Jácome, J.H., Vargas, J.J., ... Hidalgo, M. (2013). Caso probable de fiebre manchada (*Rickettsia felis*) transmitida por pulgas. *Biomédica*, 33(Sup1), 9-13. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.723>
- 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 and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Fongsaran, C., Jirakanwisal, K., Tongluan, N., Latour, A., Healy, S., Christofferson, R. C., y Macaluso, K.R. (2022). The role of cofeeding arthropods in the transmission of *Rickettsia felis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(6), 1-12. <https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1371/journal.pntd.0010576>
- Gaminara, A. (1929). Primeros estudios sobre el índice *Pulex* y *Cheopis* en las ratas de Montevideo. *Anales de la Facultad de Medicina*, 14, 365-368.
- González, A., Castro, D. del C., y González, S. (2004). Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 120(1-2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.001>
- Guimarães, J.H., Tucci, E.C., y Barros-Battesti, D.M. (2001). Siphonaptera. En *Ectoparasitos de importancia veterinaria* (pp.155-173). São Paulo: FAPESP.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Landmann, F. (2019). The *Wolbachia* Endosymbionts. *Microbiology Spectrum*, 7, 139-153. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019>
- Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, V., y Šlapeta, J. (2014). High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides*

- felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology*, 28(3), 330-336.
- Lawrence, A.L., Hii, S.F., Jirsová, D., Panáková, L., Ionică, A.M., Gilchrist, K., ... 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(3-4), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.029>.
- Lawrence, A.L., Webb, C.E., Clark, N.J., Halajian, A., Mihalca, A.D., Miret, J., ... Šlapeta J. (2019). Out-of-Africa, human-mediated dispersal of the common cat flea, *Ctenocephalides felis*: the hitchhiker's guide to world domination. *International Journal for Parasitology*, 5, 321-336.
- Lewis, R.E. (1998). Résumé of the Siphonaptera (Insecta) of the World. *Journal of Medical Entomology*, 35(4), 377-389. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.4.377>
- Linardi, P.M., y Guimarães, L.R. (2000). *Sifonápteros do Brasil*. Sao Paulo: FAPESP.
- Linardi, P.M., y Nagem, R.L. (1973). Pulicideos e outros ectoparasitos de caes de Belo Horizonte e municipios vizinhos. *Revista Brasileira de Biología*, 33 (4), 529-538.
- Linardi, P.M., y Santos, J.L. (2012). *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21, 345-354. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000400002>
- Meregildo, E.D., y Villegas, M. (2019). Peste septicémica rápidamente fatal secundaria a peste bubónica primaria inicialmente no diagnosticada: reporte de caso. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 36(3), 515-519. <https://doi.org.proxy.timbo.org.uy/10.17843/rpmesp.2019.363.4292>
- Nicholson, W.L., Sonenshine, D.E., Noden, B.H., y Brown, R.N. (2019). Ticks (Ixodida). En *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 603-672). Cambridge: Academic Press.
- Smit, F.G.A.M. (1957). Siphonaptera. En *Handbooks for the identification of British insects* (Vol. 1, p. 94). London: Royal Entomological Society of London.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 678-687.
- Urdapilleta, M., Pech, M.A., Lamattina, D., Burgos, E.F., Balcazar, D.E., Ferrari, W.A.O., ... Salomón, O.D. (2022). Ecology of fleas and their hosts in the triffinio of north-east Argentina: first detection of *Rickettsia asembonensis* in *Ctenocephalides felis felis* in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 36(1), 20-29. <https://doi.org/10.1111/mve.12546>
- Vanni, V. (1947). Morfología y clasificación de las pulgas transmisoras de peste. *Anales del Instituto de Higiene de Montevideo*, 1, 25-31.
- Venzal, J.M., Pérez-Martínez, L., Félix, M.L., Portillo, A., Blanco, J.R., y Oteo, J.A. (2006). Prevalence of *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from Uruguay. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), 305-308.

- Zhang, Y., Nie, Y., Li, L.Y., Chen, S.Y., Liu, G.H., y Liu, W. (2022). Population genetics and genetic variation of *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* in China by analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1-13.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.04.027>
- Zurita Carrasco, A. (2018). *Taxonomía, filogenia y papel vectorial de especies del orden Siphonaptera* (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla.
- Zurita, A., Callejón, R., García, Á.M., Urdapilleta, M., Lareschi, M., y Cutillas, C. (2019). Origin, evolution, phylogeny and taxonomy of *Pulex irritans*. *Medical and Veterinary Entomology*, 33(2), 296-311.
- Zurita, A., Lareschi, M., y Cutillas, C. (2023). New Insights into the Taxonomy of Malacopsylloidea Superfamily (Siphonaptera) Based on Morphological, Molecular and Phylogenetic Characterization of *Phthiropsylla agenoris* (Malacopsyllidae) and *Polygenis (Polygenis) rimatus* (Rhopalopsyllidae). *Diversity*, 15(2), 308. <https://doi.org/10.3390/d15020308>

## Anexo

### Datos de los muestreos

N.º perro	Fecha	Departamento	Nombre de Zona	Coordenadas	Nombre	Raza	Sexo	Pulgas	Especies pulgas					
									<i>C. felis</i>		<i>C. canis</i>		<i>P. irritans</i>	
									♀	♂	♀	♂	♀	♂
1	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°28'09.7"S 56°29'28.0"W)	Chicha	Cruza	H	NO						
2	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°28'09.7"S 56°29'28.0"W)	Mora	Cruza	H	SI	1					
3	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°28'09.7"S 56°29'28.0"W)	Blanquita	Cruza	H	SI	3	2				
4	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°28'09.7"S 56°29'28.0"W)	Tina	Cruza	H	SI	1					
5	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°28'14.3"S 56°29'19.1"W)	Pinky	Collie	H	NO						
6	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°28'14.3"S	Negríta	Cruza	H	NO						



7	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	56°29'19.1"W) Tamandúá - Artigas (30°28'14.3"S 56°29'19.1"W)	Layca	Cruza	H	NO			
8	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°29'09.5"S 56°29'56.8"W)	Popo	Pastor australiano	M	SI	3	1	
9	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°29'09.5"S 56°29'56.8"W)	Topador	Cruza	M	NO			
10 (+)	23/4/2022	Artigas	Puntas de Tamandúá	Tamandúá - Artigas (30°29'09.5"S 56°29'56.8"W)	Peludo	Barbilla	M	SI	4 (*)	5 (*)	1 (*)
11	23/4/2022	Artigas	Puntas de Pintadito	Pintadito - Artigas (30°29'10.9"S 56°28'17.3"W)	Manchita	collie	M	Si	5	1	
12	23/4/2022	Artigas	Puntas de Pintadito	Pintadito - Artigas (30°29'10.9"S 56°28'17.3"W)	Toby	Cruza	M	Si	11	3	
13	23/4/2022	Artigas	Puntas de Pintadito	Pintadito - Artigas (30°29'10.9"S 56°28'17.3"W)	Roy	Cruza	M	Si	5	1	
14	23/4/2022	Artigas	Puntas de Pintadito	Pintadito - Artigas (30°28'51.1"S 56°27'13.8"W)	Papa	Cruza	H	Si	3	5	

15	23/4/2022	Artigas	Puntas de Pintadito	Pintadito - Artigas (30°28'51.1"S 56°27'13.8"W)	Poly	Cruza	H	Si	9	7		
16	23/4/2022	Artigas	Puntas de Pintadito	Pintadito - Artigas (30°28'51.1"S 56°27'13.8"W)	Pantera	Cruza	H	Si	2	1		
17	23/4/2022	Artigas	Chacras de Pintado	Pintado - Artigas (30°28'22.0"S 56°27'24.2"W)	Pulguita	Cruza	M	NO				
18	23/4/2022	Artigas	Chacras de Pintado	Pintado - Artigas (30°28'22.0"S 56°27'24.2"W)	Winner	Pastor aleman	M	SI	1	1		
19	23/4/2022	Artigas	Chacras de Pintado	Pintado - Artigas (30°28'22.0"S 56°27'24.2"W)	Ambrosia	Cruza	H	SI	8			
20	23/4/2022	Artigas	Chacras de Pintado	Pintado - Artigas (30°28'22.0"S 56°27'24.2"W)	Wicker	Pastor aleman	H	SI	1			
21	23/4/2022	Artigas	Chacras de Pintado	Pintado - Artigas (30°27'03.5"S 56°27'05.1"W)	Stayci	Cruza	H	SI	1			
22	23/4/2022	Artigas	Chacras de Pintado	Pintado - Artigas (30°27'03.5"S 56°27'05.1"W)	Bruno	Cruza	M	SI	1	1		
23	23/4/2022	Artigas	Chacras de	Pintado - Artigas	Firulais	Cruza	M	SI	3	1		

			Pintado	(30°27'03.5"S 56°27'05.1"W)								
24	23/4/2022	Artigas	Chacras de Pintado	Pintado - Artigas (30°26'24.9"S 56°26'53.8"W)	Charrúa	Salchic ha	M	SI	10	1		
25	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'23.9"S 56°26'18.4"W)	Tranqui	Collie	M	SI	2	3		
26	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'23.9"S 56°26'18.4"W)	Perdido	Cruza	M	SI	4	4		
27	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'23.9"S 56°26'18.4"W)	Fino	Cruza	M	NO				
28	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'38.3"S 56°25'55.5"W)	Negro	Cruza	M	NO				
29	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'38.3"S 56°25'55.5"W)	Titi	Cruza	M	NO				
30	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'38.3"S 56°25'55.5"W)	Layca	Cruza	H	NO				
31	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'38.3"S	Bocal	Cimarr on	M	SI	1			

32	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	56°25'55.5"W) Pintado - Artigas (30°30'38.3"S 56°25'55.5"W)	Buraca	Collie P	H	SI	3		
33	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'38.3"S 56°25'55.5"W)	Milonga	Collie P	H	SI	1	2	
34	23/4/2022	Artigas	Pintado Grande	Pintado - Artigas (30°30'38.3"S 56°25'55.5"W)	Maya	Collie P	H	SI	7	2	
35	23/4/2022	Artigas	Catalán	Catalan- Artigas (30°36'22.5"S 56°25'18.4"W)	Pampa	Collie	M	SI	14		
36	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°34'05.0"S 56°24'36.3"W)	S/N	Cruza		NO			
37	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°34'05.0"S 56°24'36.3"W)	S/N	Cruza		NO			
38	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°34'05.0"S 56°24'36.3"W)	S/N	Cruza		NO			
39	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°34'05.0"S 56°24'36.3"W)	Callejera	Cruza	H	SI	5		

40	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas Callejera (30°34'05.0"S 56°24'36.3"W)	1	Cruza	H	SI	5		
41	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas Callejera (30°34'05.0"S 56°24'36.3"W)	2	Cruza	H	SI	2		
42	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°35'12.1"S 56°24'15.0"W)	Georg	Collie	M	SI	1	1	
43	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°35'12.1"S 56°24'15.0"W)	Luna	Kelpie	H	SI	1	1	
44	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°35'12.1"S 56°24'15.0"W)	Jass	Kelpie	H	SI	4		
45	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°35'12.1"S 56°24'15.0"W)	Morena	Cruza	H	SI	8	2	
46	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°35'12.1"S 56°24'15.0"W)	Tigra	Cruza	H	SI	4		
47	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas (30°35'12.1"S 56°24'15.0"W)	Sol	Collie	H	SI		1	
48	23/4/2022	Artigas	Catalancito	Catalancito - Artigas	Pampa	Collie	H	SI	5		

49	23/4/2022	Artigas	Catalancito	(30°35'12.1"S 56°24'15.0"W) Catalancito - Artigas	Manchita	Collie	M	NO			
50	23/4/2022	Artigas	Catalancito	(30°36'25.3"S 56°23'33.7"W) Catalancito - Artigas	Corbata	Collie	M	NO			
51	23/4/2022	Artigas	Catalancito	(30°36'25.3"S 56°23'33.7"W) Catalancito - Artigas	Peludo	Collie	M	NO			
52	23/4/2022	Artigas	Catalancito	(30°36'25.3"S 56°23'33.7"W) Catalancito - Artigas	Blanca	Cruza	H	NO			
53	09/05/22	Rivera	Masoller	(31°07'15.2"S 55°55'14.5"W) Masoller – Rivera	Negrita	Cruza	H	NO			
54	09/05/22	Rivera	Masoller	(31°07'15.2"S 55°55'14.5"W) Masoller – Rivera	Chicho	Cruza	M	NO			
55	09/05/22	Rivera	Masoller	(31°07'15.2"S 55°55'14.5"W) Masoller – Rivera	Ovejero	Ovejero	M	SI	3	1	
56	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°09'51.4"S 55°55'14.5"W) Lunarejo – Rivera	Lobo	Ovejero	M	SI	5		

57 (+)	09/05/22	Rivera	Lunarejo	55°52'39.3"W) Lunarejo-Rivera (31°09'51.4"S 55°52'39.3"W)	Urso	Ovejero	M	SI	8	1	
58	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'22.2"S 55°52'48.3"W)	Malu	Cruza	H	SI	6		
59 (+)	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'22.2"S 55°52'48.3"W)	Talia	Ovejero	H	SI	3	2 (*)	1 (*)
60	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'22.2"S 55°52'48.3"W)	Murrei	Cruza	M	SI	2		
61	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'22.2"S 55°52'48.3"W)	Platini	Ovejero	M	SI	2		
62	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'23.1"S 55°52'47.0"W)	Lola	Cruza	H	NO			
63	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'23.1"S 55°52'47.0"W)	S/N	Cruza	M	NO			
64	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'23.1"S 55°52'47.0"W)	Guerrero	Cruza	M	SI	2	1	

65	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'23.1"S 55°52'47.0"W)	Magui	Pitbull	H	SI	3	2		
66	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'25.3"S 55°52'49.2"W)	Luna	Cimarron	H	SI	6	3		
67	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'25.3"S 55°52'49.2"W)	Vela	Ovejero	H	SI	5	3		
68	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'30.8"S 55°52'57.7"W)	Fumasa	Pastor australiano	M	SI	2			
69	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'30.8"S 55°52'57.7"W)	Corbata	Ovejero	M	SI		2		
70	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'30.8"S 55°52'57.7"W)	Layca	Barbilla	H	SI	2			
71	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'35.1"S 55°53'05.4"W)	Gurisa	Cruza	H	SI	4	3		
72	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'35.1"S 55°53'05.4"W)	Enana	Cruza	H	SI	6	6		
73	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera	Simba	Ovejero	H	SI	3			



74	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'35.1"S 55°53'05.4"W) Lunarejo-Rivera	Sargento	Cruza	M	SI	6		
75	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'35.1"S 55°53'05.4"W) Lunarejo-Rivera	Muñeca	Ovejero	H	SI	3		
76	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'36.4"S 55°52'57.8"W) Lunarejo-Rivera	Pepe	Cruza	M	NO			
77	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'36.4"S 55°52'57.8"W) Lunarejo-Rivera	Talia	Cruza	H	NO			
78	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'36.4"S 55°52'57.8"W) Lunarejo-Rivera	Compañer a	Cruza	H	NO			
79	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'36.4"S 55°52'57.8"W) Lunarejo-Rivera	Campero	Cruza	M	NO			
80	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'36.4"S 55°52'57.8"W) Lunarejo-Rivera	Diogo	Ovejero	M	SI	1		
81	09/05/22	Rivera	Lunarejo	(31°10'43.4"S 55°52'57.8"W) Lunarejo-Rivera	Chocolate	Cruza	M	SI	6	3	

82	09/05/22	Rivera	Lunarejo	55°52'57.0"W) Lunarejo-Rivera (31°10'43.4"S 55°52'57.0"W)	Forastiero	Ovejero	M	SI	7		
83	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'13.3"S 55°52'44.3"W)	Criollo	Cruza	M	NO			
84	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'13.3"S 55°52'44.3"W)	Pinta	Dogo	H	SI	1		
85	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'13.3"S 55°52'44.3"W)	Tormenta	Cruza	H	SI	2		
86	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°10'13.3"S 55°52'44.3"W)	Paica	Dogo	H	SI	6		
87	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°09'59.4"S 55°50'45.8"W)	Safira	Galgo	H	SI	7		
88	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°09'59.4"S 55°50'45.8"W)	Oveja	Galgo	M	SI	4	1	
89	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°09'59.4"S 55°50'45.8"W)	Coli	Ovejero	M	SI	5		

90	09/05/22	Rivera	Lunarejo	Lunarejo-Rivera (31°09'59.4"S 55°50'45.8"W)	Amarilla	Cruza	H	SI	3				
91 (+)	09/05/22	Rivera	Tranqueras	Lunarejo-Rivera (31°10'50.2"S 55°48'09.2"W)	Rambo	Cruza	M	SI	1	1		3	1
92 (++)	09/05/22	Rivera	Tranqueras	Lunarejo-Rivera (31°10'50.2"S 55°48'09.2"W)	Shakira	Cruza	H	SI	3		3		1
93 (+)	09/05/22	Rivera	Tranqueras	Lunarejo-Rivera (31°10'48.6"S 55°48'19.9"W)	Lili	Cruza	H	SI	2			1	
94	09/05/22	Rivera	Tranqueras	Lunarejo-Rivera (31°10'48.6"S 55°48'19.9"W)	Negrillo	Cruza	M	SI	6	1			
95	09/05/22	Rivera	Tranqueras	Lunarejo-Rivera (31°10'48.6"S 55°48'19.9"W)	Amigo	Cimarron	M	SI	9				
96 (+)	09/05/22	Rivera	Tranqueras	Lunarejo-Rivera (31°10'48.6"S 55°48'19.9"W)	Cachorra	Cruza	H	SI	5			1	2
97 (+)	09/05/22	Rivera	Tranqueras	Lunarejo-Rivera (31°10'48.6"S 55°48'19.9"W)	Cimarrona	Cimarron	H	SI	1 (*)	1 (*)		2 (*)	1 (*)
98	09/05/22	Rivera	Masoller	Masoller-Rivera	Campeon Ovejero		M	SI	5	1			

99	09/05/22	Rivera	Masoller	(31°06'14.7"S 55°56'51.5"W) Masoller-Rivera	Napolion	Cruza	M	SI	3			
100	09/05/22	Rivera	Masoller	(31°06'14.7"S 55°56'51.5"W) Masoller-Rivera	Abrojo	Marem ano	M	SI	2			
101	09/05/22	Rivera	Masoller	(31°06'14.7"S 55°56'51.5"W) Masoller-Rivera	Campero	Cruza	M	SI	3			
102	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°31'27.2"S 55°41'05.2"W)	Luna	Cruza	H	Si		1		
103	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°31'27.2"S 55°41'05.2"W)	Tina	Cimarr on	H	Si	2			
104	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°31'27.2"S 55°41'05.2"W)	Indi	Cruza	H	Si	3	2		
105 (++)	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°14'47.9"S 55°39'44.6"W)	Pelusa	Barbilla	H	Si	1	1	4	2
106 (+)	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°14'47.9"S	Campero	Ovejero	M	Si	2	3		1

107	18/05/22	Rivera	Tranqueras	55°39'44.6"W) Rivera (31°14'39.6"S 55°39'28.6"W)	Lola	Barbilla	H	SI	1		
172	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°12'05.7"S 55°43'26.3"W)	Kira	Cruza	H	SI	4		
109	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'35.8"S 56°06'58.8"W)	Guayabo	Ovejero	M	SI	2	1	
110	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'35.8"S 56°06'58.8"W)	Pampita	Cruza	H	SI	6	1	
111	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'35.8"S 56°06'58.8"W)	Luna	Ovejero	H	SI	1	1	
112	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'35.8"S 56°06'58.8"W)	Viejita	Cruza	H	NO			
113	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'35.8"S 56°06'58.8"W)	Morena	Cruza	H	SI	2	1	
114	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'35.8"S 56°06'58.8"W)	S/N	Cruza		NO			

115	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Grande	Cruza	M	SI	2	1		
116	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Chiquita	Cruza	H	SI	1			
117	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Blanco	Cruza	M	SI	2	1		
118	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Blanca	Cruza	H	SI	1			
119	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Layca	Ovejera	H	SI	3	1		
120	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Oso	Cruza	M	SI	1	1		
121	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Yo no fui	Cruza	M	SI	1			
122	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°41'15.2"S 56°06'28.8"W)	Negrita	Pulga	H	SI	3			
123	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó	S/N	Cruza	H	NO				

124	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°41'15.2"S 56°06'28.8"W) Tacuarembó	Pequeña	Caniche	H	NO		
125	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°41'15.2"S 56°06'28.8"W) Tacuarembó	S/N	Collie	M	NO		
126	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°41'15.2"S 56°06'28.8"W) Tacuarembó	S/N	Cruza	M	NO		
127	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°40'45.6"S 56°05'54.8"W) Tacuarembó	S/N	Cruza	M	NO		
128	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°40'45.6"S 56°05'54.8"W) Tacuarembó	S/N	Cruza	H	NO		
129	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°40'23.3"S 56°05'57.8"W) Tacuarembó	Sanza	Ovejera	H	SI	1	1
130	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°40'23.3"S 56°05'57.8"W) Tacuarembó	Cachorra	Ovejera	H	SI	1	1
131	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°40'23.3"S 56°05'57.8"W) Tacuarembó	Cachorra	Ovejera	H	SI	5	

132	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	56°05'57.8"W) Tacuarembó (31°40'23.3"S 56°05'57.8"W)	Pitanga	Ovejera	M	SI	1			1
133	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°40'23.3"S 56°05'57.8"W)	Zeus	Ovejera	M	SI	2			
134	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°40'02.0"S 56°05'33.8"W)	Zapara	Barbilla	M	SI	4	1		
135	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°40'02.0"S 56°05'33.8"W)	Negro	Galgo	M	SI	1			
136	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°40'02.0"S 56°05'33.8"W)	Tila	Cimarron	H	SI	4			
137	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°40'02.0"S 56°05'33.8"W)	Galga	Galgo	H	SI	3			
138	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°40'02.0"S 56°05'33.8"W)	Raya	Cruza	H	SI	5			
139	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°40'02.0"S 56°05'33.8"W)	Amarillo	Cruza	M	SI	4			



140	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	Patiño	Cruza	M	SI	2	1		
141	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	Oficial	Cruza	H	SI		1		
142	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	Mora	Cruza	H	NO				
143	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	Blanco	Cruza	M	NO				
144	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	Oficial	Cruza	M	NO				
145	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	Bolita	Cruza	M	NO				
146	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	Tina	Cruza	H	NO				
147	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó (31°38'05.8"S 56°05'05.0"W)	S/N	Cruza	H	NO				
148	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	Tacuarembó	Chicha	Collie	H	NO				

149	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°38'05.8"S 56°05'05.0"W) Tacuarembó	Negrita	Cruza	H	SI	3			
150	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°37'09.6"S 56°02'52.9"W) Tacuarembó	Dogo	Dogo	M	SI	4	1		
151	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°37'09.6"S 56°02'52.9"W) Tacuarembó	Blanca	Dogo	H	SI	5			
152	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°37'07.9"S 56°02'47.6"W) Tacuarembó	Gaucha	Ovejera	M	SI				1
153	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°37'07.9"S 56°02'47.6"W) Tacuarembó	Cachorro	Cruza	M	SI	5	1		
154 (+)	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°37'07.9"S 56°02'47.6"W) Tacuarembó	Cachorro Grande	Cruza	M	SI	2	2		1 1
155	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°39'50.4"S 55°54'38.9"W) Tacuarembó	Bugy	Cruza	M	SI	1	1		
156	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	(31°39'50.4"S 55°54'38.9"W) Tacuarembó	Lumin	Cruza	M	SI	6	4		

157	18/05/22	Tacuarembó	Rural Tacuarembó	55°54'38.9"W) Tacuarembó (31°39'50.4"S 55°54'38.9"W)	Ramon	Cruza	M	NO						
158	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'28.9"S 55°50'42.1"W)	Pelusa	Cruza	H	Si	3	1				
159	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'28.9"S 55°50'42.1"W)	Toco	Cruza	M	Si	2					
160 (+)	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'28.9"S 55°50'42.1"W)	Mili	Cruza	H	Si	3	1			1	
161	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'27.9"S 55°50'45.6"W)	Toby	Cruza	M	Si	1					
162	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'27.9"S 55°50'45.6"W)	Flaqui	Cruza	M	NO						
163	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'27.9"S 55°50'45.6"W)	Toby	Cruza	M	NO						
164 (++)	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'27.0"S 55°50'43.1"W)	General	Ovejero	M	Si	1 (*)	1 (*)	2 (*)		4	5 (*)

165 (+)	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'27.0"S 55°50'43.1"W)	Malevo	Ovejero	M	Si	5			3 (*)	2
166	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'19.1"S 55°50'32.7"W)	Callejero	Barbilla	M	Si	3				
167	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'19.1"S 55°50'32.7"W)	Lila	Cruza	H	NO					
168	18/05/22	Tacuarembó	Bañado de Rocha	Tacuarembó (31°36'19.1"S 55°50'32.7"W)	Juana	Cruza	H	no					
169	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°14'39.6"S 55°39'28.6"W)	Pele	Cruza	M	NO					
170	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°13'36.1"S 55°41'43.3"W)	Aquiles	Cruza	M	NO					
171	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°13'36.1"S 55°41'43.3"W)	Aila	Cruza	H	NO					
172 (+)	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°14'14.3"S 55°40'34.5"W)	Corbata	Ovejera	H	Si	2			1	
173	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera	Pepe	Cruza	M	Si	4	3	2		

(+)				(31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)										
174	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)	Gustavo	Cruza	M	Si	6					
175	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)	Morena 1	Cruza	H	Si	9	1				
176	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)	Morena 2	Cruza	H	Si	8	5				
177 (+)	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)	Campero	Cruza	M	Si	2	1	1			
178	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)	Forestal	Cruza	M	Si	4	1				
179	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)	Pelusa	Cruza	H	Si	5					
180	18/05/22	Rivera	Tranqueras	Rivera (31°11'42.7"S 55°47'33.7"W)	Chicha	Cruza	H	NO						

(\* ) pulgas seleccionadas para PCR / (+) perros con dos especies de pulgas / (++) perros con tres especies de pulgas.