



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**La comunidad de
ectoparásitos del conejo de
monte: estudio de la dinámica
poblacional y de su
implicación en la transmisión
de determinadas
enfermedades infecciosas
microbianas.**

Jesús González Barrio

Jaén, Junio, 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**La comunidad de
ectoparásitos del conejo de
monte: estudio de la dinámica
poblacional y de su
implicación en la transmisión
de determinadas
enfermedades infecciosas
microbianas.**

Jesús González Barrio

Jaén, Junio, 2015

ÍNDICE

1. Resumen en Castellano.....	7
1.1. Abstract.....	7
2. Introducción.....	8
2.1. Ecología del conejo de monte.....	8
2.2. Ectoparásitos del conejo de monte. Pulgas y garrapatas.....	11
2.2.1. Garrapatas.....	11
2.2.1.1. <i>Rhipicephalus pusillus</i>	12
2.2.1.2. <i>Ixodes ventalloi</i>	12
2.2.1.3. <i>Haemaphysalis hispanica</i>	13
2.2.2. Pulgas.....	13
2.2.2.1. <i>Spilopsyllus cuniculi</i>	14
2.2.2.2. <i>Xenopsylla cunicularis</i>	14
2.2.2.3. <i>Caenopsylla laptevi</i>	15
2.3. Enfermedades más comunes en el conejo de monte.....	15
2.3.1. Enfermedades hemáticas:.....	15
2.3.1.1. <i>Borrelia</i> sp.....	15
2.3.1.2. <i>Bartonella</i> sp.	17
2.3.1.3. <i>Trypanosoma</i> sp.....	17
3. Objetivos.....	18
3.1. Objetivo principal.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. Materiales y métodos.....	20
4.1. Localización y área de estudio de los puntos de muestreo.....	20
4.2. Método de captura de los ejemplares.....	23
4.3. Métodos etiológicos.....	26
4.3.1. Toma de muestras y realización de frotis sanguíneos.	
4.3.1.1. Protocolo.....	26
4.3.2. Tinción de Giemsa.....	28

4.3.3. Observaciones al microscopio y toma de fotografías de muestras positivas.....	30
4.4. Métodos moleculares aplicados a la detección de organismos patógenos.....	30
4.4.1. Extracción de ADN.....	30
4.4.2. Protocolo de extracción de ADN de artrópodos (garrapatas, pulgas) mediante digestión con hidróxido amónico.....	33
4.4.3. Realización de una de amplificación mediante PCR de un fragmento del espaciador ribosomal ITS del género <i>Bartonella</i> sp.....	33
4.4.4. Desarrollo de un protocolo específico para la detección de <i>Bartonella alsatica</i> en conejo de monte.....	34
5. Resultados.....	35
5.1. Resultados de frotis sanguíneos.....	36
5.2. Resultados PCRs.....	38
5.3. Resultados de ectoparásitos.....	39
6. Discusión.....	42
7. Conclusiones.....	45
8. Referencias.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Conejo de monte (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) junto a la madriguera.....	7
Figura 2. Principales vías por las que el conejo afecta positivamente a la estructura y función del ecosistema mediterráneo de la Península Ibérica.....	9
Figura 3. A, macho de <i>Rhipicephalus pusillus</i> . B, hembra de <i>Rhipicephalus pusillus</i> . C, larva de <i>Rhipicephalus pusillus</i> (Imágenes originales).....	12

Figura 4. A, Hembra de <i>Ixodes ventalloi</i> y B, hembra y macho copulando de <i>Ixodes ventalloi</i> (Imágenes originales).....	12
Figura 5. A, machos de <i>Haemaphysalis hispanica</i> y B, hembra de <i>Haemaphysalis hispanica</i> a la izquierda y hembra de <i>Rhipicephalus pusillus</i> a la derecha (Imágenes originales).....	13
Figura 6. A, hembra de <i>Haemaphysalis hispanica</i> sin alimentar y B, larva de <i>Haemaphysalis hispanica</i> (Imágenes originales).....	13
Figura 7. Macho de <i>Spilopsyllus cuniculi</i>	14
Figura 8. A, Hembra de <i>Xenopsylla cunicularis</i> y B, Macho de <i>Xenopsylla cunicularis</i> (Imágenes originales).....	15
Figura 9. Hembra de <i>Caenopsylla laptevi</i>	15
Figura 10. Mapa de la localidad de muestreo.....	22
Figura 11. Mapa de España, localidad Mengíbar, punto de muestreo.....	23
Figura 12. Perímetro del <u>COTO “MADRIGUERAS”</u>	23
Figura 13. Garrapata fijada al pabellón auricular.....	28
Figura 14. Garrapata fijada en la cabeza.....	28
Figura 15. Garrapata fijada entre los dedos.....	28
Figura 16. Garrapata fijada en la pared de la bolsa.....	28
Figura 17. Vísceras del animal de las cuales extraemos el bazo.....	29
Figura 18. Obtención de una muestra de cerebro.....	29
Figura 19a y 19b. Recogida de sangre mediante pipeta Pasteur.....	30
Figura 20. Pasos seguidos en el protocolo de extracción de ADN a partir de los ejemplares de pulga y tejidos de conejo de monte.....	34
Figura 21a y 21b. <i>Borrelia</i> sp. en sangre de conejo, muestra numero 26.....	39
Figura 22a, 22b y 22c. <i>Trypanosomas nabiasi</i> en las muestras 22(a y b) y 14.....	39

Figura 23a y 23b. Corridas electroforéticas de amplificaciones mediante PCR para <i>Bartonella alsatica</i>	41
Figura 24. Dinámica poblacional de las garrapatas durante nuestro estudio.....	43
Figura 25. Dinámica poblacional de pulgas durante los meses de muestreo.....	44
Tabla 1. Amplificación por PCR	37
Tabla 2. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa. Positivos.....	40
Tabla 3. Resultados ectoparásitos. (L=Larva, N=Ninfa, M=Macho, H=hembra).....	43

1. Resumen.

Muestras sanguíneas de 46 conejos de monte capturados en poblaciones de la provincia de Jaén (Mancha Real y Mengíbar) desde Julio hasta Noviembre de 2014 y Marzo de 2015 fueron utilizadas para detectar presencia de *Trypanosoma sp* y *Borrelia sp*. Además 8 de los conejos presentaban parasitación por pulgas (*Xenopsylla cunicularis*, *Spilopsyllus cuniculi* y *Caenopsylla laptevi*) que con sus muestras de bazo y orejas se extrajo ADN para la detección de *Bartonella alsatica*. Concluyendo una prevalencia en frotis sanguíneos del 43,48% en *Trypanosoma sp* y 8,69% en *Borrelia sp*. En PCR se detectó ADN de *B. alsatica* en el 10,86%, 2,17% y 4,34% de bazo, *S. cuniculi* y *X. cunicularis*, respectivamente. Esto indica que casi el 50% de los conejos están infectados por *Trypanosoma sp*. *X. cunicularis* y *S. cuniculi* están infectadas por *B. alsatica*, bacteria con importante impacto desde el punto de vista de la sanidad animal y humana.

1.1. Abstract.

Blood samples of 46 wild rabbits captured in towns in the province of Jaén (Mancha Real and Mengíbar) from July to November 2014 and March 2015 were used to detect the presence of *Trypanosoma sp.* and *Borrelia sp.* Furthermore 8 rabbits were parasitized by fleas *Xenopsylla cunicularis*, *Caenopsylla laptevi* and *Spilopsyllus cuniculi*). DNA extracted from rabbits spleen and ears and fleas permit the detection of *Bartonella alsatica*. Our results show that prevalence in blood smears 43.48% in *Trypanosoma sp* and 8.69% in *Borrelia sp*. In PCR DNA was detected of *B. alsatica* in 10,86 %, 2,17 % and 4,34 % of spleen, and *X. cunicularis* and *S. cuniculi* respectively. This indicates that almost 50% of the rabbits are infected by *Trypanosoma sp*. In the other part, *X. cunicularis* and *S. cuniculi* are infected with *B. alsatica*, bacterium with important impact from the point of view of animal and human health.

2. Introducción.

2.1 Ecología del conejo de monte.

El conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) es un mamífero de pequeño tamaño que pertenece a la familia *Leporidae*, dentro del orden de los Lagomorfos. El conejo de monte se caracteriza por su pelaje pardo-grisáceo y rabo corto, cuya parte interna es de color blanco, potentes extremidades posteriores adaptadas para la carrera, y grandes orejas. La especie está exenta de dimorfismo sexual, y las crías, adultos y juveniles son iguales excepto en el tamaño (Gálvez, 2011). Hay un cerco pálido alrededor del ojo. Oreja gris en su mitad en la parte inferior y posterior y del color de la cabeza en su parte anterior, con un estrecho borde negro en la punta. Vientre y cara inferior de los miembros de color blanco. La fórmula dental es $2(I\ 2/1, C\ 0/0, P\ 3/2, M\ 3/3) = 28$ (Cabrera, 1914).

Es una especie muy conocida desde un punto de vista científico, ya que puede actuar como especie plaga e invasora, invirtiendo importantes cantidades de dinero en investigación (Parkes y Murphy, 2003).



Figura 1. El conejo de monte es el animal clave de los ecosistemas de la Península Ibérica. (Foto tomada por Germán Ibarra Zorrilla, 2014).

El conejo es una especie clave o esencial en la cadena trófica de la fauna ibérica, de modo que se ha estimado que en mayor o menor medida dependen de él unas 40 especies, por lo que se ha considerado a este animal como una especie básica en el conjunto de las especies que integran la fauna del monte mediterráneo,

lo que supone que su desaparición o disminución puede afectar directa o indirectamente a las especies que dependen de él (Rodríguez Sánchez, 2015).

El caso más llamativo es el del lince ibérico (*Lynx pardinus*), cuya alimentación básica está integrada en un 70-90 % por conejos, de forma que se ha considerado que la causa que más ha influido en la disminución de los linces, hasta colocarlos al borde de la extinción, ha sido la disminución de la población de conejos por las plagas sufridas por este animal (Rodríguez Sánchez, 2015). Para el águila imperial (*Aquila adalberti*) y para el citado lince (animales en peligro de extinción en la península ibérica) la dieta del conejo es esencial para su supervivencia (Moreno, 2008).

En la actualidad parece haber una tendencia a la estabilización de las poblaciones en unos niveles notablemente inferiores a los preexistentes y siempre dentro de una tónica general de escasez (Sánchez Sánchez *et al.*, 2004).

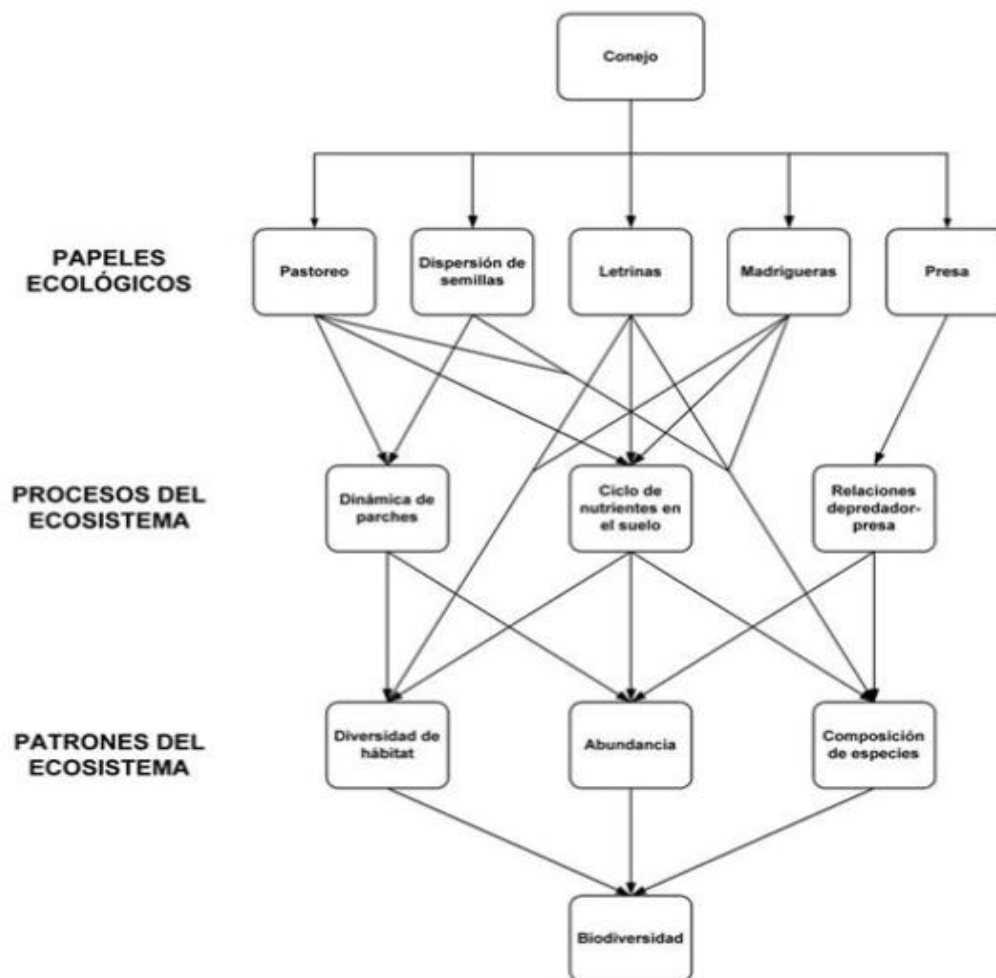


Figura 2. Principales vías por las que el conejo afecta positivamente a la estructura y función del ecosistema mediterráneo de la Península Ibérica (inspirado en Kotliar *et al.* 1999; adaptado de Delibes-Mateos *et al.*, 2008)

Los pequeños mamíferos como el conejo, constituyeron un componente fundamental de la dieta de los habitantes de la Península Ibérica desde el Paleolítico hasta la edad de Bronce (Hockett y Bicho, 2000; Callou, 2003). En yacimientos valencianos del Paleolítico superior, por ejemplo, el consumo humano de conejos en este periodo debió ser muy importante, ya que la proporción de restos del lagomorfo sobre el total de mamíferos sobrepasaba con creces el 80 % en la mayoría de los casos (Pérez Ripoll, 2005). La importancia del conejo de monte disminuyó en la Edad Media, cuando la producción de ejemplares domésticos se convirtió en algo habitual (Van Dam, 2001). Pese a todo, su carne era aún muy apreciada durante la primera mitad del siglo XX (Delibes, 1972). Hoy en día la caza del conejo en la Península Ibérica es una actividad deportiva que mueve una cantidad de dinero importante (Angulo, 2003; Angulo y Villafuerte, 2003). El conejo está considerado, junto a la perdiz roja (*Alectoris rufa*), una de las principales piezas de caza menor en la Península Ibérica (Ballesteros, 1998). Además, es la especie con mayor número de individuos abatidos en nuestras latitudes (más de 4 millones son cazados cada año en España a pesar del declive de sus poblaciones). Por todo ello, este lagomorfo tiene también una gran relevancia desde el punto de vista socioeconómico (INE, 2006).

2.2. Ectoparásitos del conejo de monte. Pulgas y garrapatas.

El fenómeno biológico del parasitismo ha atraído la atención de un gran número de autores, tanto desde el punto de vista aplicado como teórico (Allee *et al.*, 1949; Odum, 1971; Anderson, 1974; Hassel, 1976). En los últimos años el estudio de la biología de las poblaciones de parásitos (Kennedy, 1977) y de las interacciones entre los factores climáticos y poblacionales (Esch, 1977) ha recibido un fuerte impulso.

En el caso de los ectoparásitos del conejo la información se reduce fundamentalmente a los aspectos taxonómicos los cuales aún no están totalmente esclarecidos. Por otra parte, las especies ya determinadas taxonómicamente han sido estudiadas de manera muy desigual, existiendo conocimientos satisfactorios sobre la biología, ecología y comportamiento de algunas de ellas, por ejemplo, la pulga *Spilopsyllus cuniculi* (Allan, 1956; Mead-Brigg, 1964, 1977).

2.2.1. Garrapatas.

El conejo puede ser hospedador de fases larvianas y ninfales de diversas especies de garrapatas, que para completar su ciclo biológico, precisan de otros hospedadores de mayor tamaño. Un lugar de localización frecuente de las garrapatas sobre el conejo, lo representan la cabeza y ambos pabellones auriculares (Vázquez *et al.* 2006).

Las garrapatas que hemos obtenido en nuestro trabajo y que afectan al conejo son: *Haemaphysalis hispanica* (Gil Collado, 1939), *Ixodes ventalloi* (Gil collado, 1936) y *Rhipicephalus pusillus* (Gil Collado, 1936). La actividad de los adultos varía de un género a otro, así *Haemaphysalis sp.* y *Rhipicephalus sp.* aparecen sobre los conejos en los meses de primavera y verano, mientras que *Ixodes sp.* lo hace durante el invierno (Basco, 2008). La importancia de las garrapatas radica en su alimentación a partir de sangre de conejo. En casos extremos con parasitaciones muy intensas, esta acción puede ocasionar cuadros de debilidad e incluso muerte del hospedador. También se ha demostrado su papel como vector y reservorio de diversos agentes causales de enfermedades (Vázquez *et al.* 2006).

Las garrapatas duras pertenecen a la familia *Ixodidae*, siendo ectoparásitos hematófagos obligados y vectores de agentes que producen enfermedades en el hombre y los animales (Estrada y Santos, 2005).

2.2.1.1. *Rhipicephalus pusillus*.

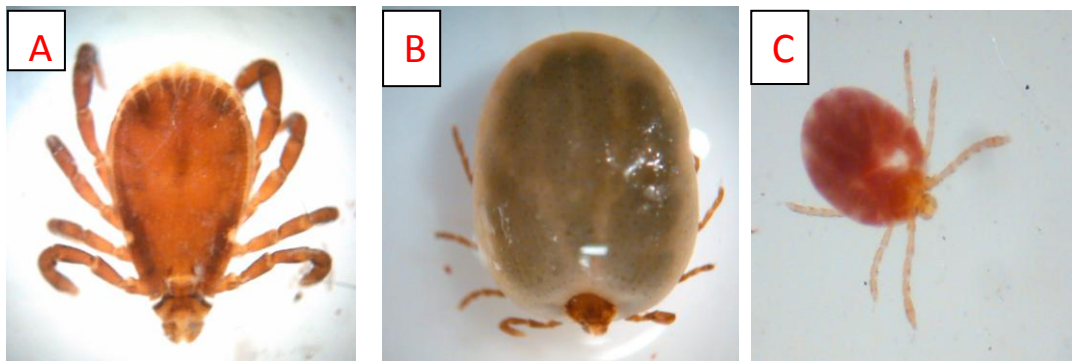


Figura 3. A, macho de *Rhipicephalus pusillus*. B, hembra de *Rhipicephalus pusillus*. C, larva de *Rhipicephalus pusillus* (Imágenes originales)

2.2.1.2 *Ixodes ventalloi*.



Figura 4. A, Hembra de *Ixodes ventalloi* y B, hembra y macho copulando de *Ixodes ventalloi* (Imágenes originales).

2.2.1.3 *Haemaphysalis hispanica*.



Figura 5. A, machos de *Haemaphysalis hispanica* y B, hembra de *Haemaphysalis hispanica* a la izquierda y hembra de *Rhipicephalus pusillus* a la derecha (Imágenes originales).



Figura 6. A, hembra de *Haemaphysalis hispanica* sin alimentar y B, larva de *Haemaphysalis hispanica* (Imágenes originales).

2.2.2. Pulgas

Spilopsyllus sp., *Xenopsylla sp.*, *Echidnophaga sp.* *Odontopsyllus sp.* y *Caenopsylla sp.* son los géneros más importantes que afectan a los conejos, en nuestro caso hemos observado *Spilopsyllus cuniculi* (Dale, 1878), *Xenopsylla cunicularis* (Smit, 1957) y *Caenopsylla laptevi iberica* Beaucornu y Márquez, 1987. Su patogenicidad se debe a una acción expoliadora ya que se alimentan de la sangre del hospedador. También provocan una reacción inflamatoria en el organismo, dependiendo de la intensidad de parasitación puede ser aguda o crónica. En las zonas afectadas por las pulgas aparece irritación e inflamación. Los factores de receptividad son la edad (animales jóvenes), el sexo, el estado fisiológico y las condiciones climáticas, entre otras. En el género *Spilopsyllus sp.* se ha demostrado que actúan como factor de receptividad los niveles hormonales del receptor (hormona adenocorticotropa). En este mismo género también se comprobó la acción atrayente del olor a orina del conejo. La fase adulta de las pulgas se localiza con frecuencia en las orejas, aunque puede llegar a aparecer por todo el cuerpo, sobre todo cuando la temperatura ambiental es baja. Los individuos recién salidos de la pupa, después de alcanzar su primer hospedador, se alimentan en la cara y el hocico y luego avanzan hacia las orejas (Vázquez *et al.*, 2006).

2.2.2.1 *Spilopsyllus cuniculi*



Figura 7. Macho de *Spilopsyllus cuniculi*
(Imagen original).

2.2.2.2. *Xenopsylla cunicularis*.



Figura 8. A, Hembra de *Xenopsylla cunicularis* y B, Macho de *Xenopsylla cunicularis* (Imágenes originales).

2.2.2.3 *Caenopsylla laptevi*.



Figura 9. Hembra de *Caenopsylla laptevi* (Imagen original).

2.2. Enfermedades más comunes en conejo de monte.

Existen dos enfermedades principales en el conejo de monte las cuales redujeron ampliamente sus densidades de población, éstas son el virus de la mixomatosis, en el conejo produce mixomas (lesiones típicas) en los párpados, en el mentón y el zona genal. Esta enfermedad ataca a los conejos en los meses más calurosos y a los jóvenes en su mayoría. Por ejemplo las pulgas pueden actuar como vectores de la mixomatosis. Por otro lado encontramos el virus de la enfermedad vírica hemorrágica (RHDV) que se transmite por el aire, por contacto conejo-conejo o por transmisión mediante las heces, en el conejo afecta de manera que produce hemorragias internas en los órganos del animal. Las incidencias de una y otra enfermedad se complementan en el conejo, de modo que mientras que la mixomatosis afecta a los conejos de modo fundamental en los meses de calor, la EVH lo hace en los meses fríos (Rodríguez Sánchez, 2015).

Otras infecciones de carácter no mortífero para el conejo pueden ser las enfermedades hemáticas como *Borrelia sp.*, *Bartonella sp.* y *Trypanosoma sp.*

2.3.1 Enfermedades hemáticas:

2.3.1.1. *Borrelia sp.*

Las bacterias del género *Borrelia sp.* pertenecen al orden *Spirochaetales*, que comprende las familias *Spirochaetaceae*, *Serpulinaceae* y *Leptospiraceae*. *Borrelia sp.* se engloba dentro de la familia *Spirochaetaceae*, y junto con *Treponema*, son los géneros de esta familia que engloban especies patógenas para los animales. En nuestra geografía, la más conocida es la llamada *Borrelia hispanica* y es transmitida al conejo mediante la infección por garrapatas. Este género comprende las espiroquetas transmitidas al animal. Las espiroquetas son organismos filamentosos, extraordinariamente largos y flexibles y con una forma característica en espiral. Las especies del género *Borrelia* son microaerófilas, móviles y se transmiten por medio de un vector artrópodo, característica fundamental que las distingue de las otras espiroquetas como *Treponema* y *Leptospira*. El reservorio de la FRTG (fiebre recurrente transmitida por garrapatas) lo constituyen los roedores (ratas, ardillas, etc.) y pequeños animales, como los conejos además de las propias garrapatas por

transmisión transovárica. La bacteria contenida en la sangre que sirve de alimento a la garrapata, se multiplica con rapidez y al cabo de horas invade todos los tejidos, incluyendo las glándulas salivales y otros órganos como el sistema genital de la garrapata. (Escudero *et al.*, 2005).

Las bacterias del género *Borrelia sp.* son parásitos obligados, ya que no se conocen formas de vida libres. El ciclo de las espiroquetas se desarrollan en dos ambientes: la garrapata, un invertebrado poiquilotermo sin sistema inmune, y los mamíferos y aves, vertebrados homeotérmicos con un sistema inmune desarrollado. Crecen óptimamente en las concentraciones de dióxido de carbono típicas del medio interno de mamíferos y aves. Estas bacterias son destruidas por encima de 50 grados en varios minutos, tampoco sobreviven en ambientes hipertónicos o hipotónicos, con la desecación, los desinfectantes comunes tales como la lejía y los detergentes. Son transmitidas por garrapatas, o raramente por contacto directo con sangre o tejidos frescos infectados, pero no por secreciones respiratorias, orina, heces o fómites. En comparación con los genomas más largos de la mayoría de las bacterias de vida libre, el genoma de género *Borrelia sp.* codifica varias proteínas con actividad biosintética. Sin embargo, estas dependen de hospedadores animales o de un medio de cultivo de laboratorio para la gran mayoría de los requerimientos (Montes *et al.*, 2014).

2.3.1.2 *Bartonella sp.*

Las pulgas transmiten muchas enfermedades bacterianas (Bitman *et al.*, 2010. Eisen *et al.*, 2012), una de ellas las puede producir mediante *Bartonella sp.*, bacterias intracelulares facultativas transmitidas normalmente por artrópodos hematófagos (Chomel *et al.*, 2009). Nos vamos a centrar en *Bartonella alsatica*, aislada en sangre de conejo europeo en el departamento de Alsacia, Francia (Heller *et al.*, 1999). El comportamiento de alimentación de sangre de algunos artrópodos juega un papel crítico en la transmisión y el mantenimiento de patógenos de transmisión vectorial en los sistemas naturales (Kent, 2009). La aplicación de técnicas moleculares para la detección de *Bartonella sp.* en pulgas ha demostrado ser útil en la determinación de la capacidad vectorial, y es una herramienta esencial para el establecimiento de un vínculo entre los vectores y patógenos potenciales (Reeves *et al.*, 2007), mientras que la detección de ADN solo se puede utilizar como

un paso preliminar en determinar que las pulgas son vectores potenciales y deben ser más estudiados. Los ectoparásitos de conejo silvestre europeo han proporcionado conocimientos sobre los procesos de co-evolución entre hospedadores (Márquez, 1991).

En 1993, las especies pertenecientes al género *Rochalimea sp.* se agruparon en el género *Bartonella sp.*. Los miembros de este género son bacterias cortas, pleomorfas e intracelulares facultativas, que pertenecen al subgrupo alfa 2 de la clase de las proteobacterias, con una proximidad filogenética respecto a los géneros *Brucella*, *Agrobacterium* y *Rhizobium*. Se trata de pequeños bacilos aerobios gran negativos. *Bartonella* reside en un reservorio natural, en el que la bacteria persiste y provoca una bacteriemia crónica intraeritrocítica, que puede ser asintomática. Se ha demostrado un tropismo por las células endoteliales. El vector se contamina en el seno del reservorio al alimentarse con su sangre. La transmisión al huésped se produce por picadura (mosquito, pulga) o por las deyecciones del vector, de modo que la penetración se produce a través de la piel (Berbis, 2010).

2.3.1.3. *Trypanosoma sp.*

Según Cevallos (2004), el género *Trypanosoma sp.* se caracteriza por utilizar dos huéspedes, uno vertebrado y otro invertebrado, para completar su ciclo de vida. Existen cuatro formas morfológicas principales de los *Trypanosoma*: tripomastigote, epimastigote, promastigote y amastigote. Las diferentes formas se distinguen entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante:

- a) En el tripomastigote el citenoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo de cuerpo del parásito, formando una membrana a lo largo del parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior.
- b) En el epimastigote, el cinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotes

- c) El promastigote tiene el cinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante.
- d) El amastigote es más esférico y no tiene flagelo libre. El cinetoplasto se ve como un cuerpo cerca del núcleo.

El ciclo de *Trypanosoma nabiasi* (Raillet, 1895) fue descrito por Grewal (1957). El conejo presenta infección por *Trypanosoma*, correspondiendo a la presencia de la especie *T. nabiasi*. El parasitismo es esencialmente hemático, por lo que viven y se desarrollan en la sangre y más concretamente en los glóbulos rojos de la misma. Para su evolución intervienen por lo general los insectos a modo de huéspedes intermediarios como pulgas y mosquitos. Suelen actuar también a nivel de los órganos hematopoyéticos. *T. nabiasis* se encuentra en conejos y es transmitido por las pulgas *Spilopsyllus cuniculi* (Quiroz, 2005).

3. Objetivos.

3.1. Objetivo principal.

El objetivo principal del estudio ha sido la detección de *Bartonella sp.*, *Trypanosomas sp.* y *Borrelia sp.* a partir de ectoparásitos obtenidos de conejo de monte.

3.2. Objetivos específicos.

- Estudio de la dinámica poblacional de ectoparásitos (garrapatas y pulgas) de conejo de monte.
- Detección e identificación de hemoparásitos en sangre de conejo de monte.

4. Materiales y métodos.

4.1. Localización y área de estudio.

El estudio se ha desarrollado en el coto privado de caza “Madrigueras”, situado entre las poblaciones de Jaén y Mancha Real con una superficie de 310 hectáreas, y el coto de caza “Los Badenes-POHM” (agrupación de varios cotos, “El piquillo”, “Ordoñez”, “Las Huelgas” y “Matorrales”) situado en el término municipal de Mengíbar con una superficie de 730 hectáreas (Véase figura 10).

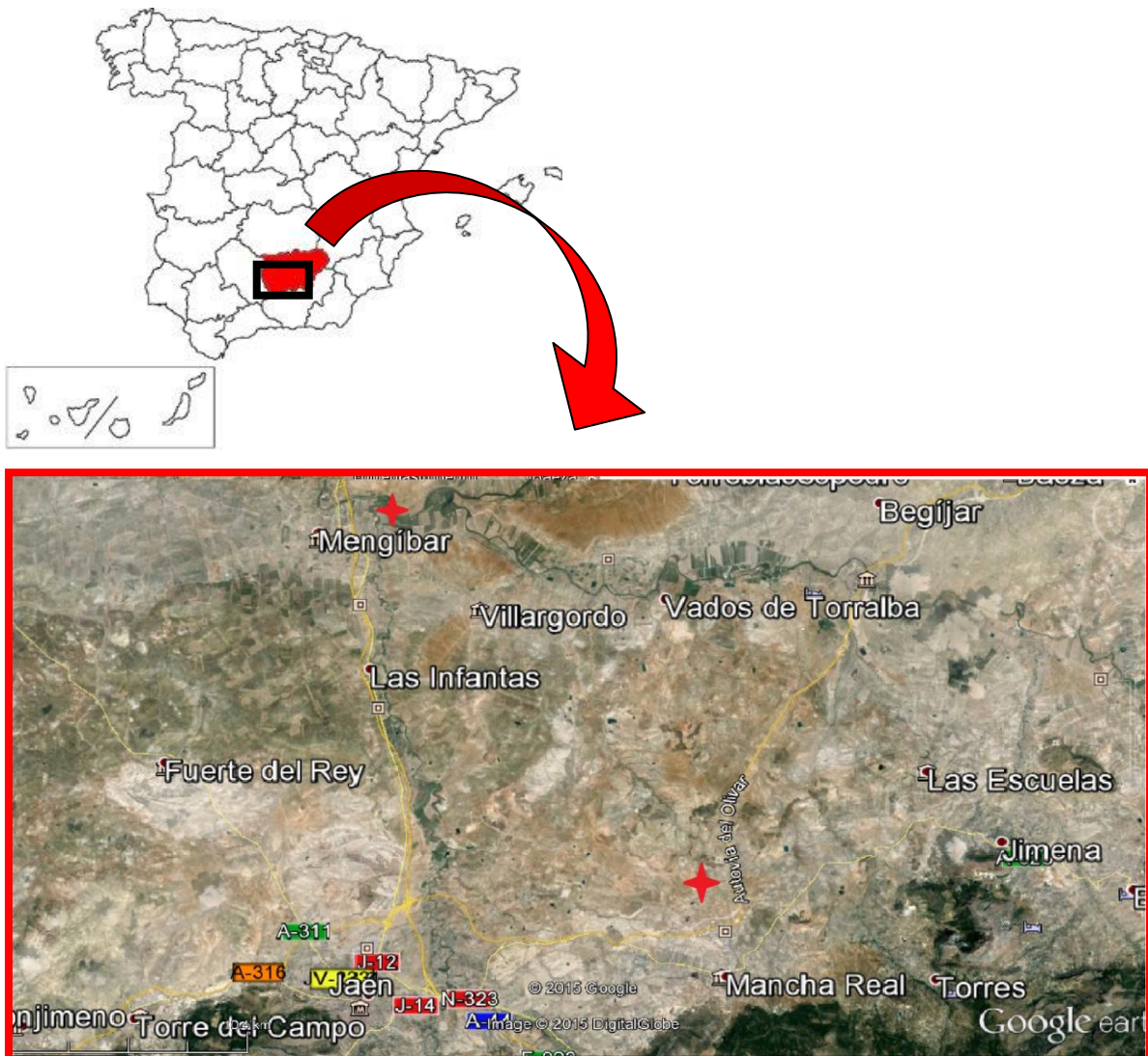


Figura 10. Mapa de España a escala 1:25.000. Las cruces rojas de la figura representan los puntos de muestreo (fuente: Google earth).

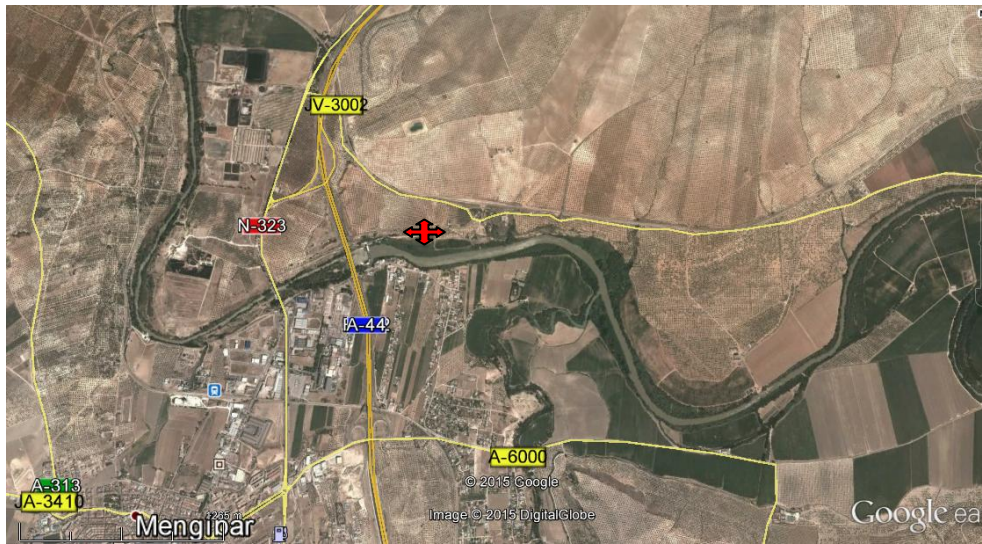


Figura 11. Mapa de Mengibar a escala 1:10.000, la cruz roja representa la zona de muestreo (fuente: Google Earth)

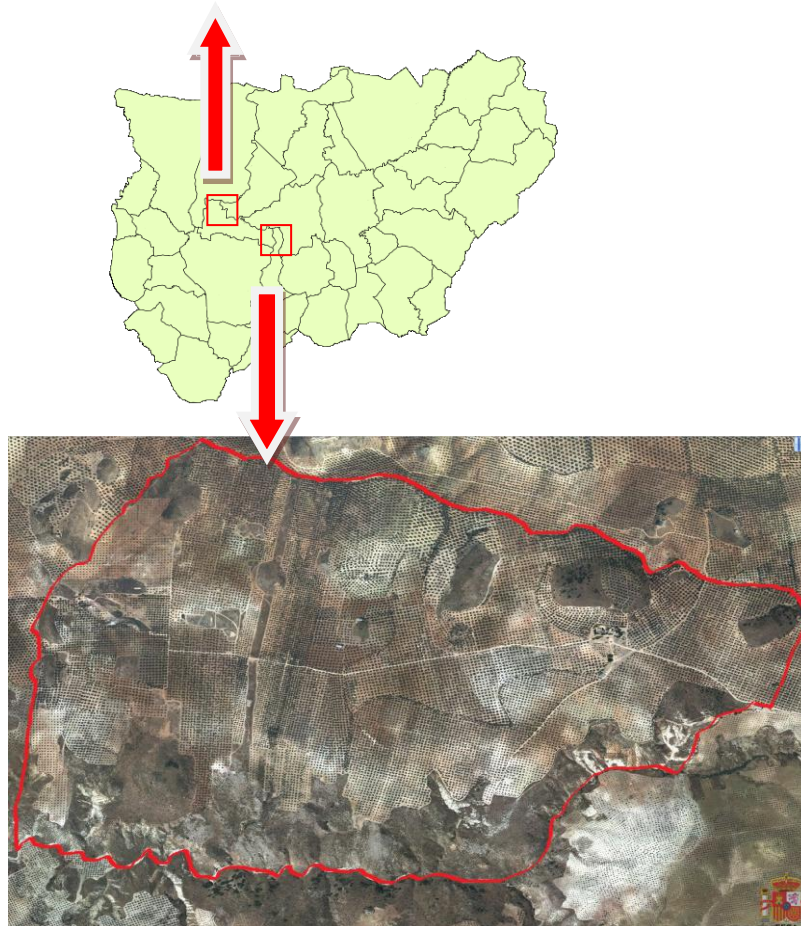


Figura 12. COTO "MADRIGUERAS". Imagen tomada de Sigpac. Escala 1:100. Perímetro del coto "Madriguera" situado en el término de Mancha Real (Jaén).

El área de estudio en el “coto Madrigueras” presenta una morfología muy abrupta, con numerosos barrancos y zonas escarpadas con altitudes que varían entre 440 metros y 505 metros de altitud, la característica que define y condiciona el paisaje son los importantes procesos erosivos que existen y tienen como consecuencia la formación de grandes barrancos que desembocan en “arroyo salado”. Desde el punto de vista geológico predominan elementos de origen carbonatado (calizas, dolomías, margas) y abundante material yesoso. Nuestra área de estudio se encuentra dentro de las Cordilleras Béticas que se extiende desde Cádiz hasta las costas meridionales del País Valenciano. En Andalucía están representados la mayor parte de sus elementos constitutivos. Clásicamente se dividen en dos grandes zonas con distinto significado paleogeográfico (Zonas Internas y Zonas Externas) aunque hay que añadir algunos términos complejos o grandes unidades (Unidad del Campo de Gibraltar y el complejo Dorsaliano) (Gámez *et al.*, 2000). El “coto madrigueras” como el coto “Los badenes- POHM” se encuentran dentro de las Zonas Externas, la cual están constituidas por materiales comprendidos desde el Triásico al Mioceno inferior-medio, en la Zona Prebética Interna, la cual presenta series estratigráficas potentes y complejas donde el triásico y jurásico presentan facies similares. El Jurásico terminal y todo el Cretácico muestran facies carbonatadas de medios marinos someros y mareales con episodios costeros y deltáicos con sedimentación detrítica. El Paleógeno está formado por arcillas, calizas y niveles detríticos de medios continentales. Tiene estructuras de pliegues divergentes NNW, fracturas de desgarre y cabalgamientos (Aguilar *et al.*, 1999).

La geomorfología del terreno está determinada por la existencia de potentes estratos constituidos por materiales blandos, fácilmente erosionables, esto provoca el encajonamiento del arroyo, aumentando así la diferencia de cotas entre el lecho del arroyo y los terrenos adyacentes, quedando reflejado esto en una mayor capacidad erosiva del agua de lluvia sobre los suelos del territorio, a escasez de precipitaciones que frecuentemente caen de forma torrencial aumenta este efecto (Marchal *et al.*, 2000).

En cuanto a la serie de vegetación edafohigrófila, nuestra área de estudio pertenece a la serie pradera-albardinal halófila (*Limonio delicatuli- Gypsophiletum tomentosae maji*), con comunidades dominadas por caméfitos rosulados y

suculentos del género *Limonium sp.*, que se desarrollan en las inmediaciones de saladares, y juncales halófilos. Presentan escasa talla pero una alta densidad. Se asientan sobre suelos fuertemente salinos y presentan una inundación muy esporádica durante el invierno. Las localidades en las que trabajamos corresponden a una termoclina mesomediterráneo semiárido. La asociación se encuentra en contacto (y a veces dispuesta en mosaico) con los saladares del *Cistancho-Arthrocnemetum*, donde hay un cierto mayor nivel freático. Hacia zonas más secas, contactan con los albardinales, espartales y romerales sobre yesos (*Dactylo-Lygeetum sparti*, *Helianthemo squamati-Stipetum tenacissimae* y *Jurineo pinnatae-Gypsophiletum struthii*). La asociación *Limonio delicatuli-Gypsophiletum tomentosae* tiene un areal bético-levantino. Las comunidades de *Limonio-Gypsophiletum* sufren al igual que otras de su misma clase un sobrepastoreo bastante nocivo, al tratarse de una vegetación que mantiene su verdor aún en las épocas más secas del año. Por esta razón, las rosetas de las diferentes especies del género *Limonium* aparecen deterioradas y devoradas por el ganado, siendo en la mayoría de los casos difícil su determinación taxonómica (Algarraba *et al*, 2004). Las especies más características del lugar son esparragueras (*Asparagus acutifolius*), torviscos (*Daphe gnidium*), lentiscos (*Pistacia lentiscus*), efedra (*Ephedra fragilis*), espinos negros (*Rhamnus lycioides*), una repoblación de pino carrasco (*Pinus halepensis*), albardín (*Lygeum spartum*).

La vegetación más característica y por tanto más abundante son los “espartales” (*Stipa tenacissima*) constituyen la formación vegetal más extendida en el territorio debido en gran medida a las plantaciones que se hicieron hace años para la obtención de fibras con las que fabricar numerosos aperos de labranza.

Las especies más representativas son el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), la liebre (*Lepus granatensis*), la tórtola común europea (*Streptopelia turtur*), la tórtola turca (*Streptopelia decaocto*), la perdiz (*Alectoris rufa*), la paloma torcaz (*Columba palumbus*) y el zorro (*Vulpes vulpes*).

4.2. Método de captura de los ejemplares:

Los ejemplares de conejo de monte capturados para su posterior procesamiento de las muestras se han obtenido gracias al aprovechamiento de la caza el cual está regulado por el Decreto 506/1971, de 25 de marzo, por el que se

aprueba el reglamento para la ejecución de la ley de caza de 4 de abril de 1970 (B.O.E. núm. 76, de 30 de marzo; corrección de errores en B.O.E. núm. 112, de 11 de mayo). Promulgada la Ley 1970, de 4 de abril, por la que se regula la protección, conservación, fomento y ordenado aprovechamiento de la riqueza cinegética nacional resulta preciso, de acuerdo con lo previsto en la disposición final 1 de la misma, que el gobierno, a propuesta del Ministerio de Agricultura, redacte y publique, en tiempo y forma oportunos, el Reglamento de la aplicación de la citada Ley. En su virtud, cumplimos los trámites establecidos en la Ley, de conformidad con el Consejo de Estado con Comisión Permanente, oído el parecer favorable del Consejo de Pesca Continental, Caza y Parques Nacionales, a propuesta del Ministerio de Agricultura y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 18 de marzo de 1971.

Los conejos fueron capturados gracias a la caza en dos localidades de la provincia de Jaén (Mancha Real y Mengibar). Una vez abatidos los ejemplares se conservaran introducidos en una bolsa de plástico para su posterior manipulación, con esto conseguimos asegurar el máximo de ectoparásitos posibles antes de que se desprendan del animal cuando se enfríe y no puedan ser contabilizados. Una vez los conejos conservados, cada uno en su bolsa correspondiente, se realizará la extracción de los ectoparásitos, éstos, quedarán adheridos a las paredes de la bolsa, sobre el conejo en cuestión o fijados a este. Se recolectaran la totalidad de estos ejemplares sobre una bandeja de experimentación, usando guantes y con unas pinzas correspondientes. Posteriormente tanto las pulgas como las garrapatas recogidas de los conejos silvestres se suspendieron en una solución de etanol al 70% que se diluyó con agua estéril y todo se almacenó en un congelador hasta que esté listo para su uso.

Todas las especies de pulgas y garrapatas se identificaron usando una taxonómica regional, claves de identificación (Márquez *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2000) y asesoría del tutor.

A continuación se llevó a cabo el proceso de evisceración del animal para la recogida de las muestras, se obtuvo una muestra de oreja, el bazo en su totalidad, una muestra de cerebro y una pequeña muestra de sangre. También se realizaron frotis sanguíneos (dos replicas por cada animal). Todas estas muestras se

conservaron junto a las muestras de los ectoparásitos en el congelador excepto los frotis sanguíneos que se almacenaron en una caja porta-objetos.

Las garrapatas extraídas del conejo pueden estar tanto adheridas a la bolsa de plástico como fijados en el animal en diferentes partes de su cuerpo como por ejemplo en los pabellones auriculares, en la cabeza, entre los dedos, etc. Todas las garrapatas se extrajeron del animal mediante la utilización de pinzas y guantes y con extremo cuidado para no romper los ectoparásitos.



Figura 13. Garrapata en pabellón auricular (Imagen original).



Figura 14. Garrapata fijada sobre la cabeza (Imagen original).



Figura 15. Garrapata incrustada entre los dedos del animal (Imagen original).



Figura 16. Garrapata pegada en la pared de la bolsa (Imagen original)

Para realizar los frotis utilizamos una pipeta Pasteur, una vez eviscerado el animal y realizando una incisión en el corazón para que la sangre fluya y poder realizarlo correctamente antes de que la sangre coagule. Se colocará un gota de sangre sobre el porta y con otro porta se extenderá de manera uniforme. Una vez efectuado lo anterior se fijará la muestra con metanol y más tarde se teñirán las muestra mediante tinción Giemsa.

Materiales:

- Alcohol etílico de 96°
- Guantes
- Pipeta Pasteur
- Portaobjetos
- Metanol
- Pinzas
- Cajas de transporte para portaobjetos
- Lápiz
- Rotulador indeleble
- Cuaderno de campo

4.3.1 Métodos etiológicos.

4.3.1.1 Protocolo, toma de muestras y realización de frotis sanguíneos

- Eviscerar el animal para la recogida de muestras (cerebro, bazo y sangre).



Figura 17. Visceras del animal (Imagen original)



Figura 18. Muestra de cerebro (Imagen original)

- Una vez extraídas todas la vísceras y recogido el bazo, mediante una pipeta Pasteur extraer una pequeña muestra de sangre para realizar el frotis sanguíneo.



Figura 19a y 19b. Ambas figuras muestran la recogida de sangre para el posterior frotis sanguíneo mediante pipeta Pasteur (Imagen original).

- Tras recoger la muestra de sangre, se coloca una gota sobre un porta y se extiende con otro portaobjetos colocando éste en un ángulo de 45°, se extiende suave y homogéneamente hacia el otro extremo de manera que se obtenga una capa fina y homogénea de sangre de mayor a menor concentración de ésta.

- Marca los portaobjetos con un lápiz, indicando la fecha y procedencia del animal, ésta información estará anotada también en el cuaderno de campo.
- Fijar las muestras introduciéndolas en metanol durante 15-20 segundos.
- Colocar las muestras en una caja portaobjetos.
- Todo el proceso se realizará con la mayor seguridad posible y con la utilización de guantes.

4.3.2. Tinción Giemsa.

Los frotis se teñirán con Giemsa al 6,67%.

Protocolo de tinción Giemsa

Tinción de Giemsa: Recomendada para la detección e identificación de parásitos sanguíneos.

1. Stock 100X Tampón Fosfato 0,67 M, pH 7,2

Na ₂ HPO ₄	59,24 g
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	36,38 g
Agua desionizada	1000,00 ml

Autoclavar o esterilizar por filtrado (poro de 0,2 µm). El tampón estéril es estable a temperatura ambiente durante 1 año.

2. Sol. trabajo tampón Fosfato 0,0067 M, pH 7,2

Stock tampón Fosfato (100x)	10,0 ml
-----------------------------	---------

Agua desionizada 990,0 ml

Comprobar el pH antes de su uso. Debe ser pH 7,2. Estable a temperatura ambiente durante 1 mes.

3. Stock tinción de Giemsa (El colorante Giemsa está disponible comercialmente. Teóricamente no caduca).

Procedencia de los reactivos y marca comercial:

- GIEMSA → Merk.
- Tampón Fosfato → Panreac.

Técnica de trabajo

Solución de trabajo de colorante Giemsa (6.67%): Haga solución fresca para cada lote de extensiones.

Tampón Fosfato 0,0067 M, pH 7,2	140 ml
Sol. stock colorante Giemsa	10 ml

Tinción

1. Preparar solución de trabajo de Giemsa en vaso de tinción, de acuerdo con las instrucciones anteriores. Debe considerarse que 150 ml son suficientes para llenar un vaso Coplin, para recipientes de otras dimensiones deben adaptarse los volúmenes mencionados para no modificar las proporciones.
2. Coloque 150 ml de tampón de trabajo Giemsa en un segundo vaso Coplin. Adapte el volumen a las dimensiones del recipiente que esté utilizando.
3. Coloque los portaobjetos en la solución de trabajo Giemsa (6.67%) durante 25 minutos.

4. Saque las preparaciones y lávelas sumergiéndolas 3-4 veces en el tampón Giemsa. Las gotas gruesas deben mantenerse en el tampón durante 5 minutos.

5. Seque las preparaciones boca arriba en un soporte.

Nota: Para reducir los tiempos de tinción pueden utilizarse soluciones más concentradas de Giemsa, de modo que podemos reducir el tiempo de tinción desde los 45-60 minutos en la solución de tinción Giemsa al 2,5%, hasta 10 minutos en una solución Giemsa al 10%. Debe considerar que acortar los tiempos de tinción mediante un incremento en la concentración de colorante puede suponer una reducción en la predictibilidad de la calidad de los resultados.

Muestras de sangre de cada conejo fueron analizadas microscópicamente una vez que realizamos todo el muestreo con la finalidad de encontrar parásitos hemáticos. Esta observación se realizó en una de las dos réplicas realizadas en preparaciones obtenidas de sangre del corazón del conejo, fijadas con metanol y coloreadas con colorante Giemsa. En esta observación se obtuvo parásitos del género *Trypanosoma* y *Borrelia*. Adicionalmente y con el mismo fin, las muestras de bazo, de oreja y las pulgas recolectadas fueron sometidas a un ensayo PCR específico para ADN de *Bartonella alsatica* ya que mediante la visualización de los frotis sanguíneos no es posible la identificación de glóbulos rojos infectados por esta ya que la infección es muy baja y es prácticamente inapreciable.

4.3.3. Observaciones al microscopio y toma de fotografías de las muestras positivas.

Los frotis sanguíneos teñidos, han sido observados al microscopio utilizando el objetivo de 100x con el fin de encontrar bacterias hemoparásitas como *Trypanosoma* o *Borrelia*.

Los frotis sanguíneos han sido observados realizando barridos en zig-zag en toda la extensión del portaobjetos. Tras realizar los barridos se han anotado las muestras positivas y mediante el programa informático de toma de imágenes

Analysis Get IT se han realizado las fotos correspondientes a *Trypanosoma sp.* y *Borrelia sp.*

4.4. Métodos moleculares aplicados a la detección de organismos patógenos

4.4.1. Extracción de ADN.

Mediante diferentes técnicas moleculares hemos obtenido ADN de bazo y de oreja de 8 muestras de conejo de monte, así como de 8 lotes de pulgas recogidas de estos conejos y separadas por especie. El ácido nucleico obtenido de la muestra (ADN y ARN) se ha extraído a partir de una pequeña muestra de tejido, tanto de oreja como de bazo, previamente fijada en etanol al 70%. Mediante un bisturí y unas pinzas, y sobre una placa Petri, se realiza un corte en la parte superior de la oreja y se toma también una pequeña muestra de bazo y todo esto en condiciones adecuadas de esterilidad. A continuación cada muestra se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril, se etiqueta adecuadamente y a partir de aquí se inicia el proceso de obtención de ADN. Para este proceso hemos utilizado el kit NucleoSpin® (Macherey Nagel, Düren, Alemania). Se ha seguido el protocolo adecuadamente desde el principio hasta el fin del experimento. Se ha utilizado a modo de control un volumen de agua bidestilada estéril que se le han realizado las mismas pruebas que a las muestras (controles negativos de extracción). Los ADN arrastrados en el procesamiento fueron conservados a -20°C hasta su posterior uso.











1	Prepare sample		Cut 25 mg tissue into small pieces	
2	Pre-Lysis		180 µl T1 25 µl proteinase K 56°C 1-3 h	
3	Lysis		200 µl B3 70°C 10 min	
4	Adjust DNA binding conditions		210 µl ethanol	
5	Bind DNA	 	load all 1 min 11,000 x g	
6	Wash silica membrane	 	1 st wash 500 µl BW 2 nd wash 600 µl B5	1 st and 2 nd wash 1 min 11,000 x g
7	Dry silica membrane	 	1 min 11,000 x g	
8	Elute highly pure DNA	 	100 µl BE (70°C) RT 1 min 1 min 11,000 x g	

Figura 20. Pasos seguidos en el protocolo de extracción de ADN a partir de los ejemplares de pulga y tejidos de conejo de monte.

4.4.2. Protocolo de extracción de ADN de artrópodos (garrapatas, pulgas) mediante digestión con hidróxido amónico.

Aplicamos una modificación del procedimiento descrito por Alekseev *et al.* (2001). Los pasos seguidos han sido:

1. Colocar la garrapata individual en un tubo eppendorf esteril (libre de DNA) de 1,7 ml "sure-lock" (o cualquier otro tubo eppendorf que tenga un cierre suficientemente seguro).
2. Romper la garrapata en el fondo del tubo con ayuda de una punta de pipeta de 200 µl.
3. Añadir 500 µl para las garrapatas adultas (200 µl para ninfas y 100 µl para larvas) de una solución al 1,25% v/v de hidróxido amónico (Fluka 09859; concentración: 27%)*.
4. Cerrar el tubo y mantener a 100 °C en el bloque térmico durante 20 min.
5. Centrifugar brevemente para recoger la condensación.
6. Abrir el tubo y devolverlo al bloque a 90 °C hasta que se haya evaporado el 50% del líquido (10 -20 min.).
7. Cerrar y almacenar a -20 °C hasta su uso.
8. Testar el DNA en diluciones 1:5 o 1:10 (en agua estéril libre de DNA).
9. Evitar al máximo los ciclos de congelación/descongelación del DNA obtenido.

En los ensayos de PCR se utilizan 2 µl de DNA sobre un volumen final de 25 µl.

*He obtenido buenos resultados en una dilución 1/20 (concentración final de 1,35%).

4.4.3. Realización de una de amplificación mediante PCR de un fragmento del espaciador ribosomal ITS del género *Bartonella* sp.

La amplificación se ha desarrollado utilizando un protocolo de PCR anidado. En la primera ronda de amplificación el ADN obtenido, tanto del tejido de conejo como de las pulgas, ha sido procesado por PCR usando los cebadores URBarto1 (5' - CTT CGT TTC TCT TTC TTC A) y Balsatrev1 (5' - CTT CTC TTC ACA ATT TCA AT). Estos cebadores amplifican el fragmento del espaciador transcrito interno de gen 16S-23S rARN (intergenic transcribed spacer ITS) de diferente tamaño según especie de *Bartonella* (Rolain *et al.* 2003b). Para la realización de este apartado,

durante la amplificación mediante PCR hemos utilizado un termociclador Gradient Biometra, con capacidad para generar gradientes de temperatura en los pocillos que constituyen el bloque. Las temperaturas iniciales de hibridación se han establecido siguiendo el programa Oligo 4. Así se ha establecido de manera concreta las temperaturas eficientes de hibridación (T_a) para los experimentos siguientes de amplificación.

Para todo el proceso de amplificación se ha utilizado un termociclador MJ-Mini Personal Thermacycler (Biorad®). En cada una de las disoluciones, 4 μ l de los ADN's extraídos se adicionan a 26 μ l de la solución madre. Obtuvimos una concentración final de 0.2 μ M para cada oligonucleótido cebador, 200 μ M para cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato (Promega), 2 mM Mg, 2 U de Biotaq™ DNA polymerase (BioLine) y tampón Bioline para PCR (1x final). Se ha utilizado los siguientes parámetros de termociclación: 96°C (90 s), seguido por 40 ciclos de 94°C (30 s), 50°C (30 s), y 72°C (60 s), seguidos de un periodo de extensión final (72°C, 7 min). En cada proceso de amplificación se ha realizado un control negativo con un volumen de control de extracción negativo igual al volumen de ADN correspondiente al protocolo.

En la segunda ronda de amplificación por PCR hemos utilizado los oligos Balsatfor2 y Balsatrev2.

4.4.4. Desarrollo de un protocolo específico para la detección de *Bartonella alsatica* en conejo de monte.

Para la detección de *Bartonella alsatica* en conejo de monte se utilizaron todas las pulgas recolectadas de las 46 muestras obtenidas (*Spilopsyllus cuniculi*, *Xenopsylla cunicularis*, *Caenopsylla laptevi*). Estas muestras las teníamos conservadas en tubos eppendorff. Estudiamos un total de 19 pulgas, 6 ejemplares *Spilopsyllus cuniculi* (6 machos), 7 ejemplares *Xenopsylla cunicularis* (3 machos, 4 hembras) y 6 ejemplares *Caenopsylla laptevi* (4 machos, 2 hembras).

Para la realización de este experimento se van a procesar tanto las muestras de tejido como las pulgas recolectadas de los conejos y se va a seguir el siguiente protocolo:

- Nested PCR-Bartonella 150324 - Orejas y bazo de conejo (JGB 150225 y JGB 1502) (8 orejas +8 bazos muestras de Mancha Real). Catorce lotes de pulgas de los mismos conejos.
- Programa balsat1 - BioRad (96.0, 1:30 seg// 94.0, 30 seg; 50, 30 seg; 68.0, 60 seg x25 ciclos// 72.0 7.0 min/ 4.0 for ever//
- Programa balsat2 - BioRad (96.0, 1:30 seg// 94.0, 30 seg; 52, 30 seg; 68.0, 60 seg x30 ciclos// 72.0 7.0 min/ 4.0 for ever//
- En el segundo PCR introducimos 5 ul del primer PCR sin diluir Tm= 50.0 °C; Tm= 52.0 °C
- Oligos recibidos 12/12/2006 Utilizamos 1 marcadores: UR: Oreja de conejo, pulgas y tejón

Gel agarosa SeaKem 1% 0,5x TBE. Cargo 8,5 ul de cada muestra. 120 V/90 min. 5 ul RedGel)

Muestra	V. final	DDW	Tampón	Mg	dNTP's	primer 1	primer 2	DNA	Taq	Σ
			10x	(25mM)	(20 mM)	(10uM)	(10uM)		(5U/ul)	
1er PCR UR						URBarto1	Balsatrev1			
30 muestras	30	19	3	0,24	0,3	0,6	0,6	6	0,2	
Control neg. 2	30	19	3	0,24	0,3	0,6	0,6	6	0,2	
Total		647	102	8,16	10,2	20,4	20,4		8,16	816
Muestra	V. final	DDW	Tampón	Mg	dNTP's	primer 1	primer 2	DNA	Taq	Σ
2do PCR UR						Balsatfor2	Balsatrev2			
20 muestras	30	22	3	0,24	0,3	0,6	0,6	3	0,2	
Total		749	63	5,04	6,3	12,6	12,6		5,04	853,26

Tabla 1. Protocolo para Amplificación por PCR.

5. Resultados.

Un total de 46 conejos fueron capturados (44 en la localidad de Mancha Real y 2 en la localidad de Mengíbar). Se obtuvieron 46 muestras de sangre, 46 muestras de bazo, 46 muestras de cerebro, una por cada conejo, y de cada uno de ellos se realizaron dos replicas de frotis sanguíneos.

Con respecto a los ectoparásitos, en las muestras de pulgas se encontraron tres especies de pulgas (*Spilopsyllus cuniculi*, *Xenopsylla cunicularis* y *Caenopsylla laptevi*) y distintas especies de garrapatas (*Rhipicephalus pusillus*, *Ixodes ventalloi* y *Haemaphysalis hispanica*).

Con respecto a las pulgas, hemos obtenido 6 ejemplares de *Spilopsyllus cuniculi* (6 machos), 7 ejemplares de *Xenopsylla cunicularis* (3 machos y 4 hembras) y 6 ejemplares de *Caenopsylla laptevi* (4 machos y 2 hembras).

En relación a las garrapatas hemos obtenido 359 ejemplares de *Rhipicephalus pusillus* (5 larvas, 94 ninfas, 143 machos y 117 hembras) 105 ejemplares de *Ixodes ventalloi* (1 larva, 34 ninfas, 31 machos y 39 hembras) y 94 ejemplares de *Haemaphysalis hispanica* (1 larva, 23 ninfas, 49 machos y 21 hembras).

5.1. Resultados de frotis sanguíneos.

- La prevalencia en sangre de conejos de hemoparásitos del género *Trypanosoma* fue del 43,48% (20/46), en concreto se identificó como *T. nabiasi*. Un total de 19/44 en la localidad de Mancha Real y 1/2 en la localidad de Mengíbar.
- Para *Borrelia* sp. (espiroquetas) la prevalencia fue del 8,69% (4/46) de las muestras examinadas.
- Todas las muestras infectadas por espiroquetas aparecen en las poblaciones de conejo de la localidad de Mancha Real.
- En las muestras recogidas de los conejos en la localidad de Mengíbar no aparecen *Spiroquetas*, puede ser debido al bajo número de muestras recolectadas.
- En un 2.17% (1/46), aparecen en la misma muestra examinada *Trypanosoma* y *Spiroquetas*.

A continuación podemos observar el género *Borrelia* en los frotis sanguíneos obtenidos a partir de sangre de conejo en el cual 4 de las 46 muestras estudiadas estaban infectadas por espiroquetas (*Borrelia sp.*).

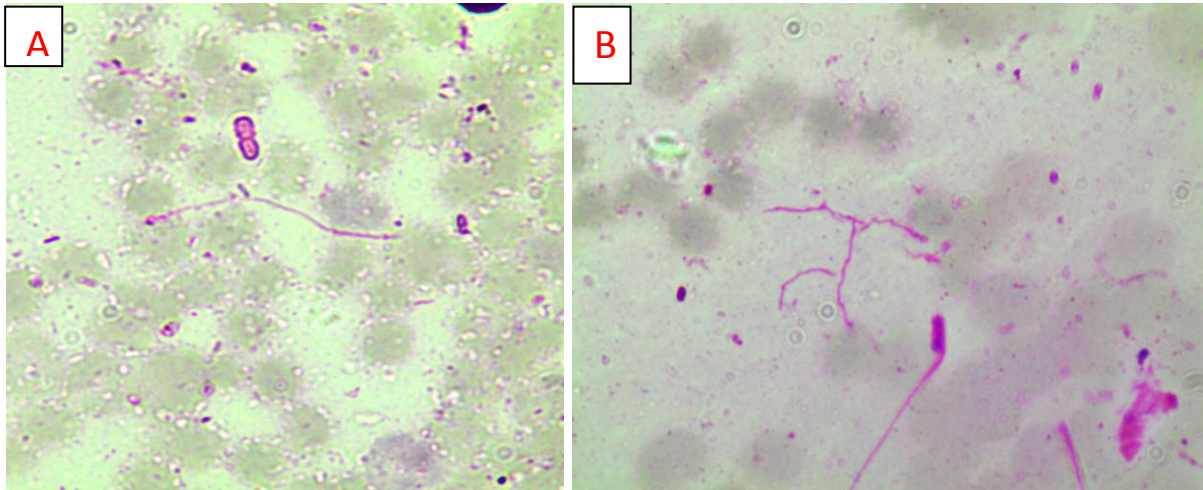


Figura 21a y 21b. *Borrelia sp.* en sangre de conejo, muestra numero 26 (Imagen original)

Aquí podemos observar el género *Trypanosoma* en las distintas muestras obtenidas en los frotis sanguíneos, en concreto en las muestras C-22, a la que corresponde las primera y segunda imagen y la muestra C-14, que corresponde con la tercera imagen.

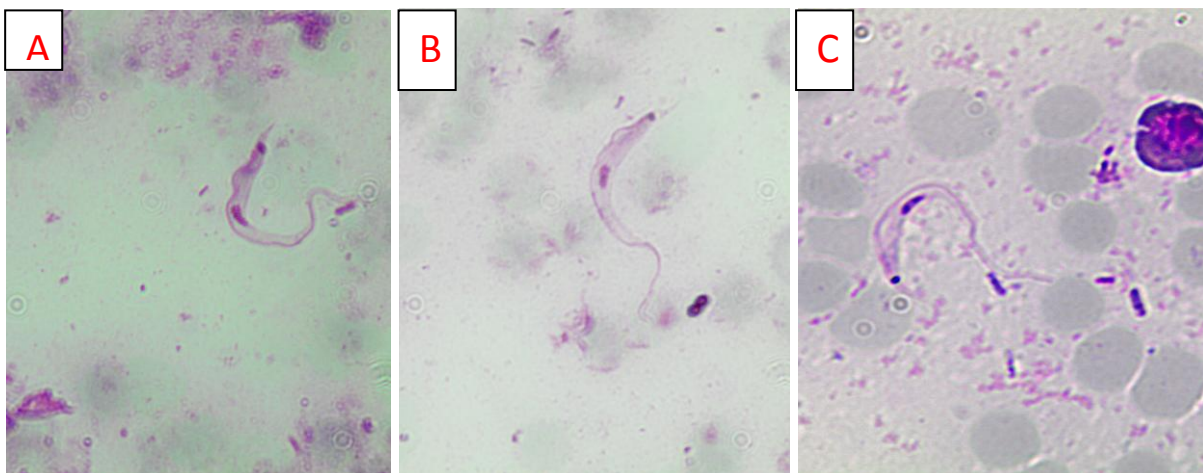


Figura 22a, 22b y 22c. *Trypanosomas nabiasi* en las muestras 22(a y b) y 14

5.2. Resultados de PCRs (*Orytolagus cuniculus*).

En total para la realización de la PCR se ha utilizado el ADN extraído de todas las pulgas recolectadas, así como los tejidos de los conejos donde había presencia de pulgas, en concreto se utilizaron 8 lotes de muestras de bazo, otros 8 lotes de muestras de oreja, y 14 lotes de muestras de pulgas (5 lotes con *Spilopsyllus cuniculi*, 5 lotes con *Xenopsylla cunicularis* y 4 lotes con *Caenopsylla laptevi*) y para completar la muestras se utilizaron dos controles negativos.

En la siguiente tabla tenemos los resultados de las diferentes PCRs llevadas a cabo en pulgas, oreja y bazo, separadas en lotes de 8 muestras. Los valores en color rojo fueron positivos para *Bartonella alsatica*.

Muestra	Oreja	Bazo	<i>Spilopsyllus cuniculi</i>	<i>Xenopsylla cunicularis</i>	<i>Caenopsylla laptevi</i>	Neg
#17	1.1	2.1	3.1			4.5
#26	1.2	2.2		3.6		4.6
#27	1.3	2.3		3.7		
#30	1.4	2.4		3.8		
#36	1.5	2.5	3.2	4.1	4.3	
#42	1.6	2.6	3.3		4.4	
#43	1.7	2.7	3.4		4.5	
#45	1.8	2.8	3.5	4.2	4.6	

Tabla 2. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa. Positivos para

La prevalencia, en bazo de los conejos, de *Bartonella alsatica* fue de 10,86% (5/46), para *Spilopsyllus cuniculi* fue de 2,17% y para *Xenopsylla cunicularis* fue de 4,34% estos datos coinciden con los de otros autores (Márquez, 2015) en el cual confirma la presencia de *Bartonella alsatica* en ADN en las pulgas *Spilopsyllus cuniculi* y *Xenopsylla cunicularis*. No se detectó presencia de *Bartonella alsatica* en ADN de oreja ni en la pulga *Caenopsylla laptevi*.

Imágenes gel.

Para realizar la adecuada electroforesis se tomaron como muestras problema los conejos los cuales presentaban alguna especie de pulga como ectoparásito y también las muestras de tejido de estos conejos, tanto de bazo como de oreja, se tomaron como problema las siguientes muestras: C17, C26, C27, C30, C36, C42, C43 y C45.

Los productos obtenidos (ADN) de la amplificación por PCR fueron analizados en electroforesis en gel y se observaron por tinción. Transcurrido un tiempo de paso sobre el gel fue coloreado y expuesto a luz UV para observar las bandas de ADN obtenidas. Una vez observadas las bandas electroforéticas y anotar los resultados positivos el gel fue fotografiado con una cámara fotográfica. Los tamaños (en pares de bases) correspondientes a las bandas fueron determinados por comparación directa con marcadores. Tras este análisis se obtuvo que no había presencias de *Bartonella alsatica* en la muestra de tejido de oreja, ni en *Caenopsylla laptevi*, en tejido de bazo sí que había presencia, así como en las pulgas *Spilopsyllus cuniculi* y *Xenopsylla cunicularis*.

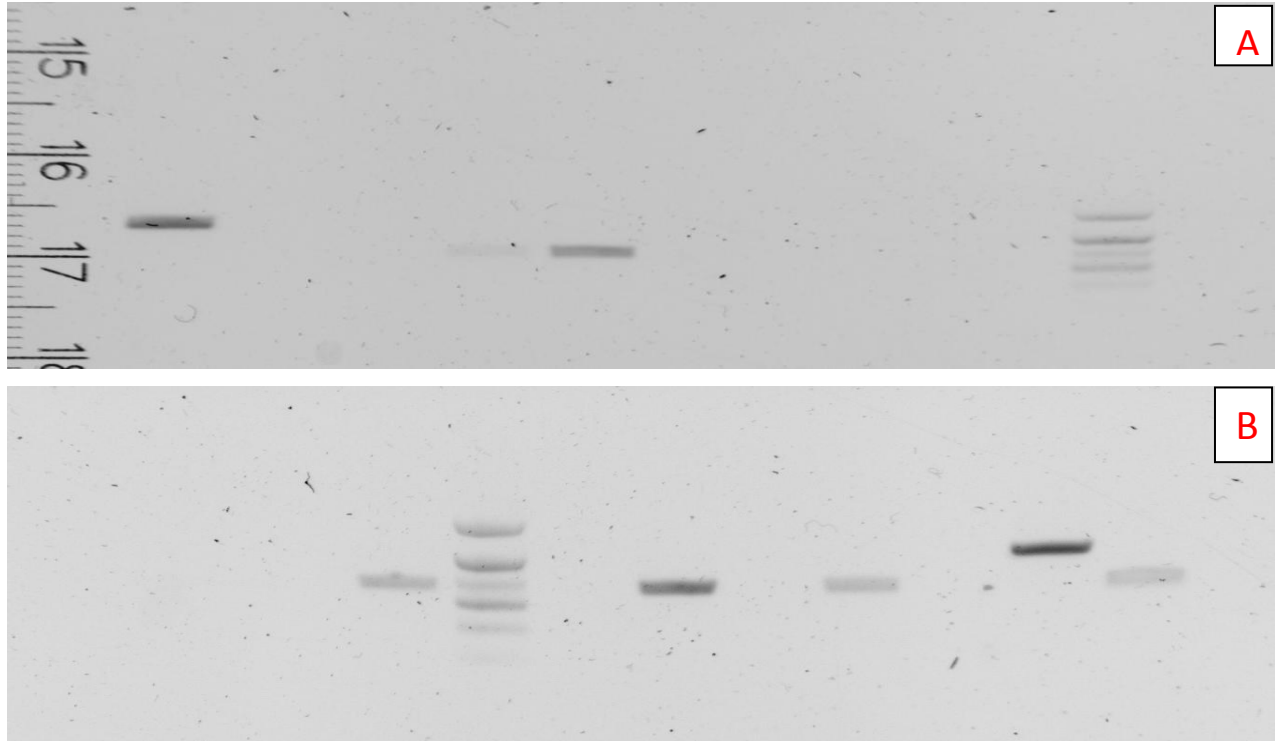


Figura 23a y 23b. Corridas electroforéticas de amplificaciones mediante PCR para *Bartonella alsatica*.

5.3. Resultado de ectoparásitos.

C.	Fecha	Lugar	<i>Rhipicephalus pusillus</i>				<i>Ixodes ventraloi</i>				<i>Haemaphysalis hispanica</i>				<i>Spilopsyllus cuniculi</i>		<i>Xenopsylla cunicularis</i>		<i>Caenopsylla laptevi</i>	
			L	N	M	H	L	N	M	H	L	N	M	H	M	H	M	H	M	H
1	27/07/2014	M. Real	0	2	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	27/07/2014	M. Real	0	2	2	5	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	
3	15/08/2015	M. Real	0	2	4	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
4	15/08/2015	M. Real	1	1	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	15/08/2015	M. Real	0	1	4	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
6	15/08/2015	M. Real	0	0	7	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	
7	15/08/2015	M. Real	0	0	3	1	0	0	0	0	0	1	2	3	0	0	0	0	0	
8	15/08/2015	M. Real	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	15/08/2015	M. Real	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	
10	15/08/2015	M. Real	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	
11	15/08/2015	M. Real	1	1	1	6	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	
12	23/08/2014	M. Real	0	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13	23/08/2014	M. Real	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
14	23/08/2014	M. Real	0	10	5	17	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
15	23/08/2014	M. Real	0	3	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	23/08/2014	M. Real	0	0	3	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	23/08/2014	M. Real	1	6	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
18	23/08/2014	M. Real	0	5	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	30/08/2014	M. Real	0	2	7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
20	30/08/2014	M. Real	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
21	30/08/2014	M. Real	1	2	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	30/08/2014	M. Real	1	17	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	30/08/2014	M. Real	0	27	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	30/08/2014	M. Real	0	5	5	4	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	
25	30/08/2014	M. Real	0	2	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26	30/08/2014	M. Real	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
27	06/09/2014	M. Real	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	
28	13/10/2014	M. Real	0	0	0	0	0	5	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
29	13/10/2014	M. Real	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
30	13/10/2014	M. Real	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	
31	13/10/2014	M. Real	0	1	0	1	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32	13/10/2014	M. Real	0	0	0	2	0	6	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
33	18/10/2014	M. Real	0	0	0	0	0	1	2	4	0	1	2	1	0	0	0	0	0	
34	18/10/2014	M. Real	0	0	3	0	0	4	4	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
35	18/10/2014	M. Real	0	0	1	1	0	2	5	7	0	0	6	0	0	0	0	0	0	
36	01/11/2014	M. Real	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	1	0	1	
37	02/11/2014	M. Real	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
38	02/11/2014	M. Real	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

C.	Fecha	Lugar	<i>Rhipicephalus pusillus</i>				<i>Ixodes ventralloi</i>				<i>Haemaphysalis hispanica</i>				<i>Spilopsyllus cuniculi</i>		<i>Xenopsylla cunicularis</i>		<i>Caenopsylla laptevi</i>	
			L	N	M	H	L	N	M	H	L	N	M	H	M	H	M	H	M	H
39	08/11/2014	M. Real	0	1	2	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	
40	08/11/2014	M. Real	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
41	08/11/2014	M. Real	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
42	13/11/2014	M. Real	0	0	0	1	0	0	6	9	1	0	0	1	0	0	0	1	0	
43	13/11/2014	M. Real	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	
44	15/11/2014	M. Real	0	0	0	0	0	4	4	0	1	5	1	0	0	0	0	0	0	
45	15/11/2014	M. Real	0	0	0	0	0	3	1	3	0	3	0	1	0	2	0	1	0	
46	16/11/2014	M. Real	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
47	07/03/2015	Mengíbar	0	0	4	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	
48	07/03/2015	Mengíbar	0	0	4	4	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	

Tabla 3. Resultados ectoparásitos en conejo. (L=Larva, N=Ninfa, M=Macho, H=hembra)

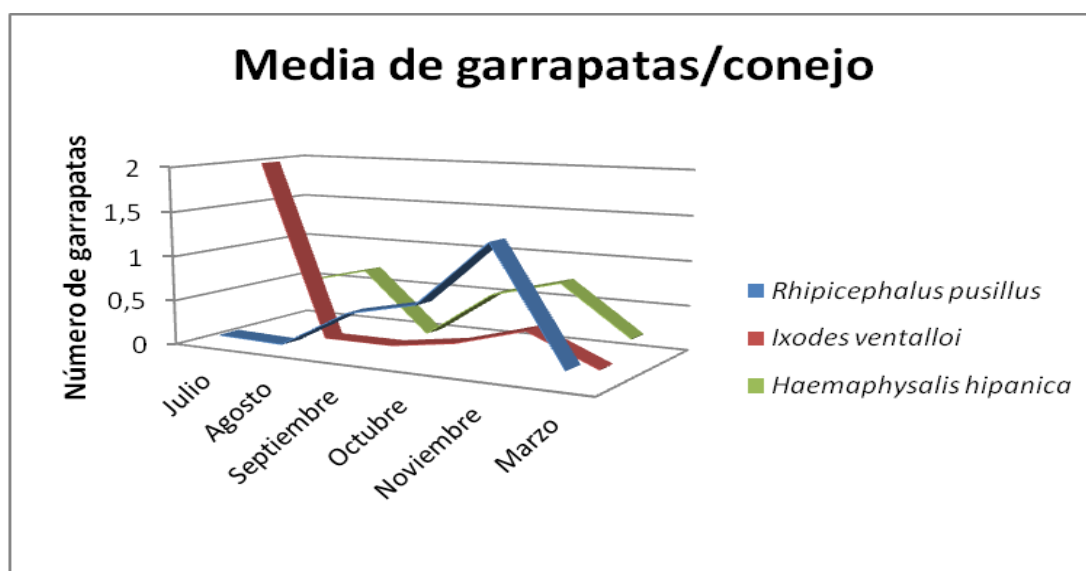


Figura 24. Dinámica poblacional de las garrapatas durante nuestro estudio.

Como podemos observar en la figura 24, tanto las pulgas como las garrapatas tiene un distribución poblacional anual, así como, *Rhipicephalus pusillus* aparece en repartido durante todo el muestreo, pero más en los meses de octubre y noviembre *Ixodes ventralloi* la encontramos principalmente en los meses de más frío, en otoño e invierno y *Haemaphysalis hispanica* la encontraremos en los meses de verano y otoño.

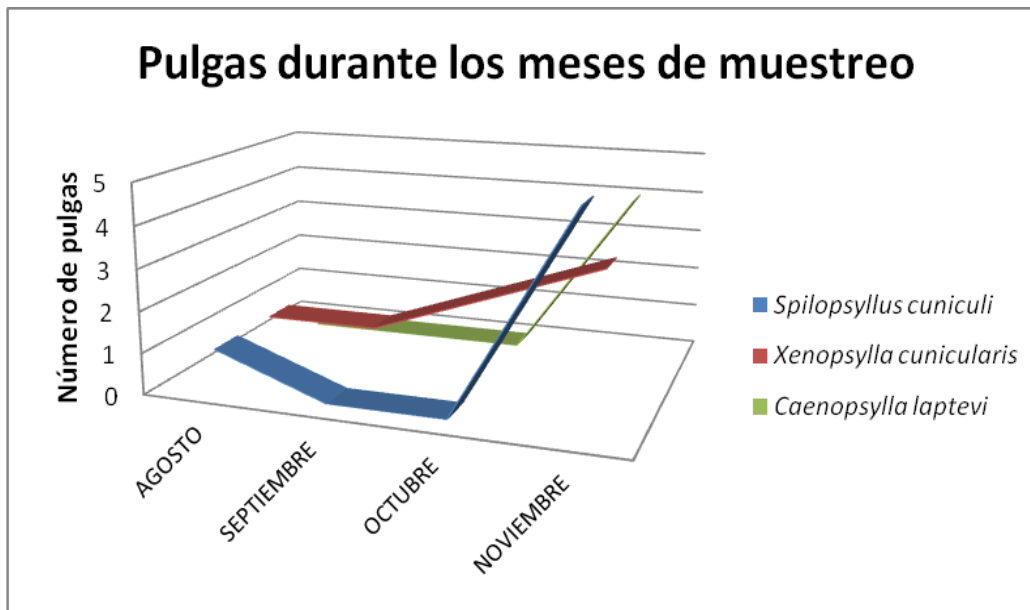


Figura 25. Dinámica poblacional de pulgas durante los meses de muestreo.

Como se puede observar en la figura 25, las pulgas también siguen un patrón estacional, así *Spilopsyllus cuniculi* aparece con índices más altos durante los meses de octubre y noviembre, *Xenopsylla cunicularis* empieza a aumentar el número de ejemplares a partir de septiembre y *Caenopsylla laptevi* tiene una distribución en aumento a partir de octubre.

6. Discusión.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la presencia de patógenos hemáticos como *Borrelia sp*, *Trypanosoma sp* y *Bartonella sp*. en poblaciones infectadas naturalmente de conejos de monte de la provincia de Jaén y en sus ectoparásitos hematófagos (pulgas y garrapatas). También se tomaron muestras de bazo y oreja de los conejos infectados por pulgas para determinar la presencia de *Bartonella sp* en dichos tejidos. Para ello, una vez cazados los conejos eran introducidos en bolsas para evitar que sus ectoparásitos abandonen el cuerpo una vez que este se enfríe. Para poder estudiar la evolución en el tiempo, abundancia y variedad de las especies de garrapatas presentes en los conejos, los muestreos deben ser realizados con la misma metodología para poder asegurar el máximo número de ectoparásitos capturados y así poder contabilizarlos. Se determinó la especie y género de cada ectoparásito hematófago, el sexo y su estadio.

Se han identificado tres especies de pulgas, *Spilopsyllus cuniculi*, *Xenopsylla cunicularis* y *Caenopsylla laptevi*, durante los meses de julio, agosto, septiembre, octubre, noviembre de 2014 y marzo de 2015, estas especies se encuentran normalmente parasitando al conejo monte (de Adrián, 2001; Márquez, 2015).

Estas pulgas se encuentran en mayor índice durante los meses de otoño e invierno como ya estaba descrito por de Adrián, 2001. En cuanto a las garrapatas identificadas en este estudio fueron: *Rhipicephalus pusillus*, *Ixodes ventalloi* y *Haemaphysalis hispanica*, su presencia es normal en conejos. Los ejemplares de *Rhipicephalus pusillus* aparecen durante los meses de primavera y verano, *Ixodes ventalloi* en los meses de otoño e invierno y *Haemaphysalis hispanica* durante el verano y otoño (Basco, 2008). Tanto la dinámica poblacional de las pulgas como la de garrapatas se ajusta a la descrita por otros autores (Márquez, 1988; Márquez, 1990; Márquez, 1992; Rothschild, 1973; Osacar, 2001)

El muestreo de este estudio en cuanto al número de conejos fue muy reducido, y podría deberse a las malas condiciones climatológicas ocurridas durante el pasado año junto con las bajas precipitaciones que se produjeron, esto trajo como consecuencia que el alimento para los conejos fuera insuficiente, por tanto fue muy difícil la captura de ellos mediante la caza al haber grupos reducidos de conejos. Al igual que el de pulgas que puede ser debido al transporte del conejo hasta la bolsa, ya que una vez abatido el conejo, este fue cobrado por perros de caza y las pulgas se desprenden fácilmente del animal.

La prevalencia, en sangre de los conejos, de *Trypanosoma* fue de 43,48% (20/46) en concreto se identificó como *T. nabiasi*, difiere de otros estudios (Reglero *et al.*, 2007) en los que fue del 80,19%, esto podría deberse a que en nuestro estudio obtuvimos un tamaño muestral no apropiado o simplemente porque en estas poblaciones de conejos la prevalencia de *Trypanosoma* es menor. Hay falta de estudios anteriores sobre la identificación y distribución de *Trypanosoma* en las poblaciones de conejo españolas (Reglero *et al.* 2007). La prevalencia, en sangre de los conejos de *Borrelia* fue de 8,69% (4/46).

La prevalencia, en bazo de los conejos, de *Bartonella alsatica* fue de 10,86% (5/46), para *Spilopsyllus cuniculi* fue de 2,17% y para *Xenopsylla cunicularis* fue de 4,34% estos datos coinciden con los de otros autores (Márquez, 2015) en el cual confirma la presencia de *Bartonella alsatica* en ADN en las pulgas *Spilopsyllus*

cuniculi y *Xenopsylla cunicularis*. La detección de *Bartonella alsatica* no se realizó mediante frotis sanguíneos ya que no es el método más adecuado debido a que no se observa en frotis sanguíneos por su baja parasitación en sangre y es muy difícil su observación.

Utilizamos la técnica de la PCR para detectar el ADN de *Bartonella alsatica* en tejidos como el bazo y la oreja de aquellos conejos que estaban parasitados por alguna de las tres especies de pulgas. Determinamos la presencia de este patógeno zoonosico en un 62,5% de las muestras de bazo de los conejos, lo que nos indica que este patógeno causa infección sistémica en los conejos; mientras que no encontramos en ninguna muestra de oreja el ADN de la bacteria. En dos (*Spilopsyllus cuniculi* y *Xenopsylla cunucularis*) de las tres especies identificadas de pulgas encontramos ADN de *Bartonella*, la encontramos durante los meses de noviembre para *Spilopsyllus cuniculi* y en los meses de septiembre y octubre para *Xenopsylla cunicularis*. Al menos dos informes anteriores indican la detección de *Bartonella alsatica* en la pulga *Spilopsyllus cuniculi* de un gato montés europeo (*Felis silvestris silvestris*) en Andalucía, España (Márquez, 2009) y de los conejos salvajes del sur de Francia (Kernif, 2010) utilizando amplificación por PCR y secuenciación.

Esto nos indicaría que estos artrópodos hematófagos podrían actuar como potenciales vectores de *Bartonella alsatica* (Márquez, 2015), tanto para otros animales como para las personas, sobre todo para aquellas personas con contacto directo con el campo, ya que pueden ser objeto de parasitación por parte de pulgas con el consiguiente riesgo para la salud pública, sobre todo para cazadores, veterinarios, investigadores de fauna silvestre y senderistas entre otros. Más estudios sobre la dinámica poblacional de estos ectoparásitos hematófagos y sobre el papel que juegan como posibles vectores de enfermedades que afectan a otros animales, sobre todo animales domésticos, y personas serían necesarios para esclarecer la relación del patógeno-vector y establecer así medidas de control y preventivas que disminuyan el contagio.

7. Conclusiones.

- Se han encontrado los principales ectoparásitos del conejo de monte tanto garrapatas (*Rhipicephalus pusillus*, *Ixodes ventalloi* y *Haemaphysalis hispanica*) como pulgas (*Caenopsylla laptevi*, *Xenopsylla cunicularis* y *Spilopsyllus cuniculi*).
- Los parásitos encontrados en sangre de conejo pertenecen al género *Borrelia*, *Trypanosoma*, en concreto a la especie *Trypanosoma nabiasi* y al género *Bartonella*, en concreto *Bartonella alsatica*.
- Tanto *Borrelia* como *Trypanosoma* son transmitidos por garrapatas y *Bartonella* es transmitido por pulgas (*Xenopsylla cunicularis* y *Spilopsyllus cuniculi*).
- La dinámica poblacional de garrapatas sigue un patrón en el cual *Rhipicephalus pusillus* aparece en los meses de primavera y verano, *Ixodes ventalloi* la encontramos en los meses de otoño e invierno y *Haemaphysalis hispanica* la encontraremos en los meses de verano y otoño.
- La dinámica poblacional de pulgas aparecen mayoritariamente en los meses de otoño en invierno.

8. Referencias.

- Aguilar Ruiz, J., Galán Huertos, E. y Gómez Ariza, J.L. (1999). Estudios de elementos traza en suelos de Andalucía. *Geología y Litología*. 4: 97-101.
- Alekseev, A.N., Dubinina, H.V., Van De Pol, I., Schouls, L.M. (2001). Identification of *Ehrlichia* sp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J Clin Microbiol*. 39: 2237-42.
- Algarra Ávila, J. A., Arrojo Agudo, E., Asensi Marfil, A., Cabello Piñar, J., Cano Carmona, E., Cañadas Sánchez, E. M., Cueto Romero, M., Dana Sánchez, E., De Simón Navarrete, E., Díez Garretas, B., García Fuentes, A., Giménez Luque, E., Gómez Mercado, F., Jiménez Morales, M. N., Linares Cuesta, J. E., Lorite Moreno, J., Melendo Luque, M., Montoya Fernández, M. C., Mota Poveda, J. F., Navarro Reyes, F. B., Peñas De Giles, J., Salazar Mendías, C., Torres Cordero, J. A., Valle Tendero, F. (2004). Series de vegetación edafohigrófila de Andalucía. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente. pág 136-137
- Allan, R. M. (1956). A study of the populations of the rabbit flea. *Spilopsyllus cuniculi* on the wild rabbit. *Oryctolagus cuniculus* in Scotland. *Proceedings Royal Entomological Society London*, 31: 145-152.
- Allee, W.C., Emerson, A. E., Park, T. y Schmidt, K.P. (1949). Principles of Animal Ecology Saunders. *Philadelphia* , pág 873.
- Anderson, R. M. (1974). Mathematical models of the host helminth interaction. In: Usher, M.B. y Williams, M. *Ecological Stability Chapman and Hall*. pág. 43–59 London.
- Angulo, E. (2003). Factores que afectan a la distribución y abundancia del conejo en Andalucía. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Angulo, E., Villafuerte, R. (2003). Modelling hunting strategies for the conservation of wild rabbit populations. *Biological Conservation*. 115:291-301.

- Ballesteros, F. (1998). Las especies de caza en España. Biología, Ecología y Conservación. Colección Técnica. Estudio y Gestión del Medio, Oviedo, España.
- Basco, P. B., Alvaro, A. D. C., Guajardo, S. C., García, A. S. O. y Sancho, F. V. (2008). Estudio de control biológico de garrapatas en la finca La Garganta. *Revista complutense de ciencias veterinarias*, 2(2): 73-84.
- Berbis, P. (2010). Bartenolosis, *EMC- Dermatología* 4: 1-8.
- Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M.F., Raoult, D. (2010). Fleas and flea-borne diseases. *International society for infectious diseases*. 14: 667–676.
- Cabrera, A. (1914). Fauna ibérica. Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Callou, C. (2003). De la garenne au clapier. Étude archéozoologique du lapin en Europe occidentale. *Mémoires du Muséum National d'Historie naturelle*, Paris, Francia 101(2): 371-372.
- Cevallos, A.M., Hernández, R. (2004). *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Departamento Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Breitschwerdt, E. B., Kasten, R. W., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R. J., ... y Dehio, C. (2009). Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Veterinary research*, 40(2): 1-22.
- De Adrián, M. S. G. y Zumeta, J. B., (2001). Pulgas (*Insecta: Siphonaptera*) colectadas en los monegros (Zaragoza). *Zapateri: revista aragonesa de entomología*, (9), 85-88.
- Delibes, M. (1972). La caza en España. Alianza Editorial, Madrid, España

- Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P., y Villafuerte, R. (2008). Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conservation Biology*, 22(5): 1106-1117.
- Eisen, R. J., y Gage, K. L. (2012). Transmission of Flea-Borne Zoonotic Agents. *Annual review of entomology*, 57: 61-82.
- Esch, G. W., Hazen, T. C., y Aho, J. M. (1977). Parasitism and r-and K-selection. In *Regulation of parasite populations* (pág. 9-62). Academic Press New York.
- Escudero Nieto, R., y Guerrero Espejo, A. (2005). Enfermedades producidas por *Borrelia*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 23(4), 232-240.
- Estrada Peña A. y Santos Silva M.M. (2005). The distribution of ticks (*Acari: Ixodidae*) of domestic livestock in Portugal. *Exp. Appl. Acarol.* 36: 233-246.
- Gálvez Bravo, L. (2011). Conejo– *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758).
- Gámez, J. A., Torres, J. A., García, A., Fuentes, L., y Cano, E. (2000). Comunidades vegetales sobre dolomías en el parque natural de Sierra Mágina: un hábitat a conservar. *Sumuntan*, (13): 39-46.
- Grewal, M. S. (1957). The life cycle of the British rabbit *trypanosome*, *Trypanosoma nabiasi* (Railliet, 1895). *Parasitology*, 47(1-2): 100-118.
- Hassel, M. P. (1976), The dynamics of competition and preciation Arnoide. Londres, pág 68.
- Heller, R., Kubina, M., Mariet, P., Riegel, P., Delacour, G., Dehio, C., ... y Piémont, Y. (1999). *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *International journal of systematic bacteriology*, 49(1): 283-288.
- Hockett, B.S., Bicho, N.F. (2000). The rabbits of Picareiro Cave: small mammal hunting during the late Upper Palaeolithic in the Portuguese Estremadura *Journal of Archaeological Science* 27: 715-743.
- INE (Instituto Nacional de Estadística) (2006). Caza: piezas cobradas por especie, número/peso/valor/ y año. Instituto Nacional de Estadística, Madrid, España

- Kennedy, C. R. (1977). The regulation of fish parasite population. In: Esch, G. W. *Regulation of Parasite Populations* (pág 63-110). Academic Press Nueva York
- Kent, R. J. (2009). Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Molecular ecology resources*, 9(1): 4-18.
- Kernif, T., Parola P, Ricci, J.C., Raoult D, Rolain, J.M. (2010). Molecular detection of *Bartonella alsatica* in rabbit fleas, France. *Emerg Infect Dis.* 16:2013–4.
- Kotliar, N.B., Baker, W.B., Wicker, A.D., Pluma, G. (1999). A critical review of assumptions about the prairie dog as a keystone species. *Environmental Management* 24:177-192.
- Marchal, F., Torres, J. A., Salazar, C., Siles, G., y Cano, E. (2000). Notas sobre la vegetación semiárida en las estribaciones de Sierra Mágina (Jaén). *Sumuntán*, 13: 83-90.
- Márquez F. J. (1991). Relations de similitude entre les espèces de tiques du Lapin de garenne, *Oryctolagus cuniculus* . *Bull Soc Franç Parasitol* 9:271–8.
- Márquez, F. J. (1988). [Population dynamics of *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938 (Acarina, Ixodidae) in 1986-1987 in south-eastern Spain: modelling of the biological cycle]. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 64(5), 374-390.
- Márquez, F. J. (1990). Dinámica de la población de *Ixodes ventalloi* Gil Collado, 1936 (Acarina, Ixodidae) durante 1986-1987 en el sureste de España. *Rev. Ibér. Parasitol*, 50(1-2): 101-114.
- Márquez, F. J. (1992). Evolution of the population of *Haemaphysalis hispanica* in the south east of Spain. *Vie et milieu*. Paris, 42(1): 41-49.
- Márquez, F. J. (2015). Detection of *Bartonella alsatica* in European wild rabbit and their fleas (*Spilopsyllus cuniculi* and *Xenopsylla cunicularis*) in Spain. *Parasites & vectors*, 8(1): 1-5.

- Márquez, F. J., Morel, P. C., Guiguen, C. y Beaucournu, J. C. (1992). Clé dichotomique des *Ixodidae* d'Europe. I: Les larves du genre *Ixodes*. *Acarologia*, 33(4), 325-330.
- Márquez, F.J., Millán, J., Rodríguez Liébana, J.J., García Egea, I., Muniain, M.A. (2009). Detection and identification of *Bartonella* sp. in fleas from carnivorous mammals in Andalusia, Spain. *Med Vet Entomol.* 23:393–8.
- Mead-Brigg, A. R., (1977). The *European Rabbit*, The *European rabbit* flea and myxomatosis. In: Coaker, T. D. Applied Biology (pág 193-261). *Academic Press*. Londres
- Mead-Briggs, A. R. (1964). The reproductive biology of the rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale) and the dependence of this species upon the breeding of its host. *Journal of Experimental Biology*, 41(2): 371-402.
- Montes, F. O., Dorado, J. S., Espinar, C. P., y Ezcurra, M. M. (2014). Infecciones producidas por *borrelias*: enfermedad de Lyme y fiebre recurrente. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(51): 3009-3017.
- Moreno, S., Beltrán, J. F., Cotilla, I., Kuffner, B., Laffite, R., Jordán, G., ... y Villafuerte, R. (2008). Long-term decline of the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in south-western Spain. *Wildlife Research*, 34(8): 652-658.
- Odum, E.P. (1971). Fundamentals of ecology. Saunders. *Philadelphia*, pág 574.
- Osacar Jimenez, J. J., Lucientes Curdi, J. y Calvete Margolles, C. (2001). Abiotic factors influencing the ecology of wild rabbit fleas in north-eastern Spain. *Medical and veterinary entomology*, 15(2): 157-166.
- Parkes, J.; Murphy, E. 2003: Management of introduced mammals in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 30: 335-359.
- Pérez Ripoll, M. (2005). Caracterización de las fracturas antrópicas y sus tipologías en huesos de conejo procedentes de los niveles gravetienses de la Cova de les Cendres, Alicante. *Munibe*. 57:239-254.

- Quiroz Romero H. (2005). Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos pag 86.
- Reeves, W. K., Rogers, T. E., Durden, L. A., y Dasch, G. A. (2007). Association of *Bartonella* with the fleas (*Siphonaptera*) of rodents and bats using molecular techniques. *Journal of vector ecology*, 32(1): 118-122.
- Reglero, M., Vicente, J., Rouco, C., Villafuerte, R. y Gortazar, C. (2007). *Trypanosoma* spp. infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) during a restocking program in Southern Spain. *Veterinary parasitology*, 149(3): 178-184.
- Rodríguez Sánchez, J. A., (Abril 2015). Proyecto Sierra de Baza, revista digital.
- Rolain, J. M., Franc, M., Davoust, B., y Raoult, D. (2003). Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging infectious diseases*, 9(3): 339.
- Rothschild, M. y Ford, B. (1973). Factors influencing the breeding of the rabbit flea (*Spilopsyllus cuniculi*): A spring-time accelerator and a kairomone in nestling rabbit urine with notes on *Cediopsylla simplex*, another "hormone bound" species. *Journal of Zoology*, 170(1): 87-137.
- Sánchez, M. A., Sánchez-Zapata, J. A., y Díez de Revenga, E. (2004). El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en la Región de Murcia. In ANSE. *Actas del II Congreso de la Naturaleza de la Región de Murcia* (pág. 169-179).
- Van Dam, P. J. (2001). Status loss due to ecological success. Landscape change and the spread of the rabbit. *Innovation: The European Journal of Social Science Research*, 14(2): 157-170.
- Vázquez, L., Dacal, V., Panadero, R. (2006). Principales ectoparásitos del conejo. Departamento de Patología Animal. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo. *Boletín de Cunicultura*, 147: 29-30.
- Walker, J.B. , Keirans, J.E. y Horak, I. G. (2000). The genus *Rhipicephalus* (*Acari: Ixodidae*). A guide to the brown ticks of the world, 1ª ed. New York,