

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/50
I.S.B.N.: 978-84-15939-28-3

MERCEDES LÓPEZ GONZÁLEZ

**Helmintofauna de roedores de Canarias.
Estudio faunístico, ecológico y molecular**

Directores

**PILAR FORONDA RODRÍGUEZ
CARLOS FELIU JOSÉ
MARIANO HERNÁNDEZ FERRER**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Después de varios intentos de realización de una Tesis Doctoral, tengo que agradecer a mis Directores el hecho que, después de muchos años, ésta haya sido posible. A la Dra. Pilar Foronda, quién tras años de amistad se convirtió en mi compañera de trabajo y una de mis directoras de Tesis. Al Dr. Carlos Feliu, por permitirme colaborar en sus proyectos, y posteriormente depositar su confianza en mí para la realización de la presente Memoria. A ambos tengo que agradecer la iniciación en un campo nuevo de la investigación, la Parasitología, y el entusiasmo que me transmitieron a la hora de trabajar en él. Al Dr. Mariano Hernández, quién hace mucho tiempo me inició en el mundo de la Genética y supo transmitirme el interés y la curiosidad por la Biología Molecular en una época difícil de mi vida. Además deseo agradecerle se haya mantenido a mi lado hasta este momento. Mis sinceros agradecimientos a los tres por inculcarme el rigor científico y por apoyarme. Indudablemente, al margen del trabajo, ahora son mucho más que Directores de Tesis para mí.

La elaboración de esta Tesis ha sido posible gracias a la financiación aportada por los Proyectos Nacionales CGL 2006-04937 y CGL 2009-07759, y el Proyecto 2009 SGR 403 financiado por “La Generalitat de Catalunya”. Además agradecer al Director del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC), Dr. Basilio Valladares, por el uso de sus instalaciones para la realización de la mayor parte del trabajo de laboratorio.

Mis compañeros de laboratorio han estado siempre ahí, haciéndome pasar buenos ratos, ayudándome cuando hacía falta y motivándome en los momentos de flaqueza. A Teresa Acosta y José Antonio, que conocen y han vivido conmigo momentos difíciles en nuestra etapa de investigación y me han apoyado en numerosas ocasiones. A mi querido Tilman (“el listillo”), que empezó como un becario más y acabó siendo mi gran amigo, estando siempre ahí, incluso en la distancia. A Vero, Hari, y más recientemente a María y a Fabi, por escucharme y empujarme siempre hacia adelante.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos y compañeros de antigüedad, y que no han dejado que me rindiera en este camino: Toña, Néstor, Elena y Cris Pou, por su empuje hasta el final. A Ángela, Aarón, y los Drs. Jordi Miquel y Jordi Torres, por ser

partícipes en gran parte de la realización de este trabajo, especialmente en el trabajo de campo. Mención especial al Dr. Juan Carlos Casanova, quién no ha podido ver finalizada esta Tesis.

Por último, mi agradecimiento a mis padres y hermanos, por apoyarme siempre y confiar en mí a lo largo de los años, y aguantar mis ausencias. Y a Berto, por todo, por no dejarme caer y por el sacrificio que ha supuesto también para él.

*A mi padre,
ojalá estuvieras aquí!*

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1. Archipiélago Canario.....	4
1.2. <i>Rattus rattus</i> (Linneo, 1758) y <i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769).....	5
1.3. <i>Parastrongylus</i> (= <i>Angiostrongylus</i>) <i>cantonensis</i> (Chen, 1935).....	7
1.4. Hymenolepididae (Cestoda: Cyclophyllidea).....	9
1.5. Parasitofauna de murinos de El Hierro.....	10
1.6. Estructura y justificación de la Tesis Doctoral.....	11
I. Genetic characterization of black rat (<i>Rattus rattus</i>) of the Canary Islands: origin and colonization.....	13
II. Finding of <i>Parastrongylus cantonensis</i> (Chen, 1935) in <i>Rattus rattus</i> in Tenerife, Canary Islands (Spain).....	23
III. Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain).....	29
IV. Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach.....	41
2. OBJETIVOS	53
3. METODOLOGÍA	57
3.1. Muestreo de roedores.....	57
3.2. Muestras de parásitos.....	58
3.3. Identificación morfológica de los parásitos.....	59
3.3.1. Protozoos.....	59
3.3.2. Helmintos.....	59
3.3.3. Ectoparásitos.....	59
3.4. Análisis molecular.....	60
3.4.1. Extracción de ADN.....	60
3.4.2. Amplificación y secuenciación.....	60
3.4.3. Análisis filogenéticos.....	61

3.5. Muestras de hospedadores intermediarios.....	62
3.6. Determinación de metales pesados.....	62
3.7. Análisis estadístico.....	62
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Estudio genético de la rata negra de las Islas Canarias: posible origen y modo de colonización.....	65
4.2. Primera cita de <i>Parastrongylus cantonensis</i> en rata negra (<i>Rattus rattus</i>) de Tenerife.....	67
4.3. Estudio sobre la distribución y variación genética de hymenolepídeos en murinos de Canarias.....	67
4.4. Estudio multidisciplinar de los parásitos en murinos de El Hierro.....	68
5. DISCUSIÓN	73
5.1. Acerca de aspectos genéticos y biogeográficos.....	73
5.1.1. En relación a <i>Rattus rattus</i>	73
5.1.2. En relación a <i>Parastrongylus cantonensis</i>	74
5.1.3. En relación a cestodos Hymenolepididae.....	76
5.2. Acerca de aspectos faunísticos.....	78
5.2.1. En relación a <i>Rattus rattus</i>	79
5.2.2. En relación a <i>Mus musculus domesticus</i>	81
5. 3. Acerca de aspectos medioambientales y de salud pública.....	86
6. CONCLUSIONES.....	89
7. REFERENCIAS.....	93

1. Introducción General

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Durante los últimos 200 años, tiempo en el cual los humanos han alterado drásticamente la tierra, muchas plantas y animales se han convertido en desplazados como efectos secundarios de las actividades humanas. Otros han sido introducidos deliberadamente en nuevas áreas o han ampliado su distribución a raíz de la ruptura de las barreras biogeográficas por parte del hombre (Tarachewski, 2006).

Muchas invasiones biológicas mediadas por los seres humanos son recientes y algunas de ellas están bien documentadas, constituyendo "experimentos naturales" que ofrecen la oportunidad de estudiar los procesos evolutivos en general y el efecto fundador, en particular (Abdelkrim *et al.*, 2005). Numerosos estudios genéticos se han aprovechado de la introducción de especies para comprender la estructura genética y la historia de las poblaciones. Además, la comprensión de la colonización y la propagación de las especies introducidas son prioritarias para la conservación biológica debido al impacto de las especies invasoras en la fauna y flora autóctonas (Simberloff, 1996).

Como es sabido, la llegada de especies a nuevos ambientes puede llevar asociada una fauna parasitaria, que podría tener más o menos éxito al colonizar nuevos territorios. Este éxito depende de muchos factores, según se trate también de especies parásitas de ciclo directo o indirecto. El grado en el que estas especies puedan afectar o entrar en contacto con otros hospedadores depende también del grado de especificidad que posean, habiendo parásitos de especificidad amplia y otros de especificidad muy reducida, incluso exclusivos de una especie hospedadora en concreto (oioxenia) (ver Tarachewski, 2006).

Los factores anteriormente citados pueden ser tanto de tipo abiótico como biótico. Las condiciones de humedad y temperatura, la vegetación, la presencia de hospedadores intermediarios adecuados, densidades óptimas de hospedadores definitivos e intermediarios, etc., condicionan sobremanera la colonización de nuevos hábitats por parte de los parásitos.

Los roedores, especialmente las especies de Murinae -*Rattus exulans*, *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*, y *Mus musculus*-, por su capacidad colonizadora, representan algunos de los vertebrados más ampliamente introducidos, por acompañar a los seres

humanos en su historia de dispersión global (Drake and Hunt, 2009). Están presentes en muchas regiones del mundo, incluidas las islas, donde las especies invasoras son las principales responsables de ciertas extinciones y del cambio de los ecosistemas (Townsend *et al.*, 2006).

Como reservorios de un amplio número de patógenos, los roedores tienen una gran importancia en el ámbito de la salud pública y medioambiental. Estos patógenos podrían llegar con sus hospedadores cuando son introducidos en nuevas regiones.

1.1. Archipiélago Canario

El archipiélago canario es de origen volcánico y está situado frente a la costa occidental del continente africano (entre los 13°23' y 18°8' Oeste, y los 27°37' y 29°24' Norte). Compuesto por siete islas y varios islotes, su carácter oceánico lo hace especialmente interesante desde el punto de vista de la biodiversidad, siendo considerado “punto caliente” en el Planeta (Myers *et al.*, 2000) en riqueza y endemismo de especies, entre las cuales se encuentran también los helmintos (Foronda *et al.*, 2009). Además, la separación geográfica de los continentes por un lado, y de las islas entre sí por otro, convierte al archipiélago en un escenario favorable para impedir la migración y el flujo génico entre las poblaciones de determinadas especies, permitiendo su diferenciación.

Históricamente, el archipiélago canario ya era conocido por las culturas clásicas del Mediterráneo, pero fue redescubierto y visitado por marineros genoveses, mallorquines, portugueses y franceses durante el siglo XIV (Fregel *et al.*, 2009). En esa época, ya existía una población humana indígena que habitaba las islas. Según datos arqueológicos (Onrubia-Pintado, 1987) y moleculares (Rando *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2003), parece ser que los asentamientos humanos más antiguos se remontan al primer milenio A.C., y tuvieron su origen en el norte de África. A partir de entonces, muchas especies de flora y fauna han sido introducidas en el archipiélago, con diferente grado de impacto sobre la biota y ecosistemas insulares. Entre ellas se encuentra el grupo de los pequeños mamíferos, en el que se incluyen los roedores, objeto de estudio en esta Tesis.

En la actualidad se sabe que existen al menos dos especies introducidas de rata, la rata negra (*Rattus rattus* Linneo, 1758) y la rata parda (*Rattus norvegicus* Berkenhout,

1769), y una de ratón, el ratón común (*Mus musculus* Linneo, 1758), sustituyendo por completo a las también tres especies endémicas de murinos extintos: las ratas gigantes (*Canariomys bravoii* Crusafont-Pairó y Petter, 1964 y *Canariomys tamarani* López-Martínez y López-Jurado, 1987), y el ratón de malpaís (*Malpaisomys insularis* Hutterer, López-Martínez y Michaux 1988), que habitaban algunas de las islas antes de la llegada del hombre.

Sin embargo, a pesar de que los roedores actuales son muy comunes en el archipiélago, los datos sobre helmintos parásitos de hospedadores canarios están referidos principalmente al hombre y a otros grupos de animales, tanto domésticos como silvestres. Hasta el momento se han denunciado alrededor de 60 especies de platelmintos en vertebrados terrestres (Gijón Botella *et al.*, 1982, 1985; Castillo, 1988; Castillo and López Román, 1989; Cordero del Campillo *et al.*, 1994; Roca *et al.*, 1999; Foronda, 2002; Foronda *et al.*, 2000, 2005; etc) y unas 30 especies de nematodos (Valladares *et al.*, 1982, 1987; Cordero del Campillo *et al.*, 1994; Toledo *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 1997; Foronda, 2002; Foronda *et al.*, 2004).

Para una mejor comprensión de los trabajos que han sido la base de la presente Memoria, veamos algunas peculiaridades en relación a ellos:

1.2. *Rattus rattus* (Linneo, 1758) y *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)

Se trata de dos especies que se diferencian bien por caracteres morfológicos externos y craneales (ver Yiğit *et al.*, 1998), por su composición cromosómica (Chinen *et al.*, 2005) y por datos moleculares (Robins *et al.*, 2007; 2008).

Rattus rattus es originaria de la península índica, y según datos del ADN mitocondrial parece haber llegado a Europa sólo durante el Neolítico o la Edad de Bronce, constituyendo el denominado “Linaje I” (Aplin *et al.*, 2011). Posteriormente y desde el continente se dispersó con los barcos a buena parte del mundo, de ahí el nombre con el que también se le conoce, “ship-rat” (rata de barco) (Fig. 1). El trabajo realizado por Aplin *et al.* (2011) ofrece una exhaustiva información sobre los diferentes linajes mitocondriales y la distribución del llamado “Complejo *Rattus rattus*” (RrC).

Por otro lado, *R. norvegicus* es originaria del norte de China y llegó a Europa posteriormente a *R. rattus*. A pesar de ser una especie invasora generalizada, los datos genéticos de *R. norvegicus* de poblaciones silvestres son aún escasos (Bastos *et al.*, 2011). Sin embargo, sí existen numerosos estudios sobre el origen y la composición genética de las poblaciones de rata negra de distintas zonas geográficas del mundo, basados en datos de ADN nuclear y mitocondrial (ver Abdelkrim *et al.*, 2005; Matisoo-Smith and Robins, 2009; Tollenaere *et al.*, 2010; Bastos *et al.*, 2011; Pagés *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011; Aplin *et al.*, 2011).

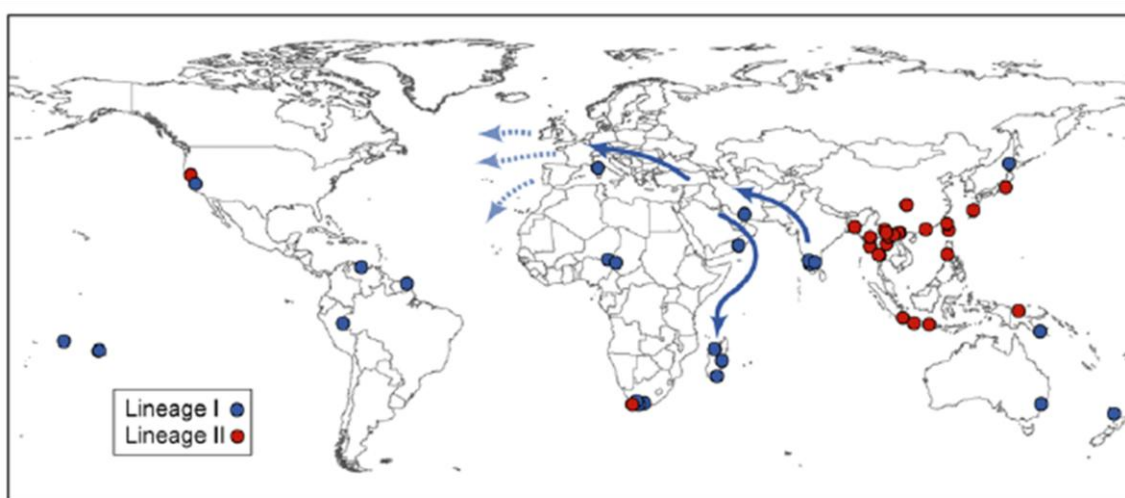


Figura 1. Distribución global de los Linajes I (*Rattus rattus*) y II (*Rattus tanezumi*) (extraído de Aplin *et al.*, 2011).

En Canarias, varios estudios paleontológicos han documentado la presencia de estos murinos en el archipiélago y hasta ahora se creía que su introducción habría tenido lugar en el siglo XIV, tras el contacto europeo (ver Nogales *et al.*, 2006; Rando *et al.*, 2008). Sin embargo, las recientes dataciones radiométricas de restos óseos sugieren que la introducción de *R. rattus* en Lanzarote ocurrió antes de la Edad Media europea, mientras que en Fuerteventura sería coincidente con la conquista de la misma (Rando *et al.*, 2012). La introducción de *R. norvegicus* parece mucho más reciente y habría tenido lugar en el siglo XVIII (Nogales *et al.*, 2006). Actualmente ambas especies se encuentran en todas las islas, pero no en los islotes (Martín *et al.*, 2000). La rata negra se distribuye por todo el medio rural y natural, mientras que la rata parda se encuentra principalmente en ciudades, pueblos y, a veces en las zonas costeras (Traveset *et al.*, 2009). Por otro lado, el

ratón podría haber llegado a las islas orientales con los primeros humanos (Alcover *et al.*, 2009) y está presente en todos los hábitats canarios, siendo menos abundante en la laurisilva (Traveset *et al.*, 2009).

A pesar de todos estos estudios, poco se sabe sobre el posible origen y el proceso de colonización de las ratas en las Islas Canarias. No obstante, parece lógico pensar que el patrón de colonización pudiera estar ligado a los desplazamientos humanos y no seguir necesariamente el modelo *stepping-stone* desde el continente, muy frecuente en archipiélagos. En la actualidad los pasos de colonización, áreas de origen y los eventos de introducción pueden ser inferidos mediante estudios genéticos con marcadores neutrales (Avice, 2000), lo que contribuirá también a interpretar la distribución actual de las mismas.

Además de los estudios paleontológicos mencionados anteriormente, numerosos trabajos han sido realizados sobre el impacto que los murinos han tenido sobre la biota nativa de las islas (ver revisión de Traveset *et al.*, 2009), así como de la fauna parasitaria y bacteriana que presentan. En este sentido cabe destacar los publicados en los últimos años y que denuncian por primera vez la presencia de especies zoonóticas como *Parastrongylus cantonensis* (Foronda *et al.*, 2010) y *Leptospira* spp. (Foronda *et al.*, 2011b).

1.3. *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* (Chen, 1935)

El nematodo *P. cantonensis* (Fig. 2A) es un parásito pulmonar de roedores murinos (Géneros *Rattus*, *Bandicota*, *Melomys*) (Soulsby, 1982; Acha and Szyfres, 2003). El hombre es un hospedador accidental no permisivo (Eamsobhana, 2006) y adquiere el parásito por la ingestión de larvas de tercer estadio (L3) presentes en los hospedadores intermediarios o paraténicos como moluscos y crustáceos (Wang *et al.*, 2008) o vegetales contaminados (ver Fig. 2B). En el hombre puede producir varias patologías (angiostrongyliasis), siendo la más grave la causada por la migración de las larvas hacia el cerebro, provocando meningitis eosinofílica, una de las enfermedades infecciosas emergentes en la China continental (Lv *et al.*, 2009).

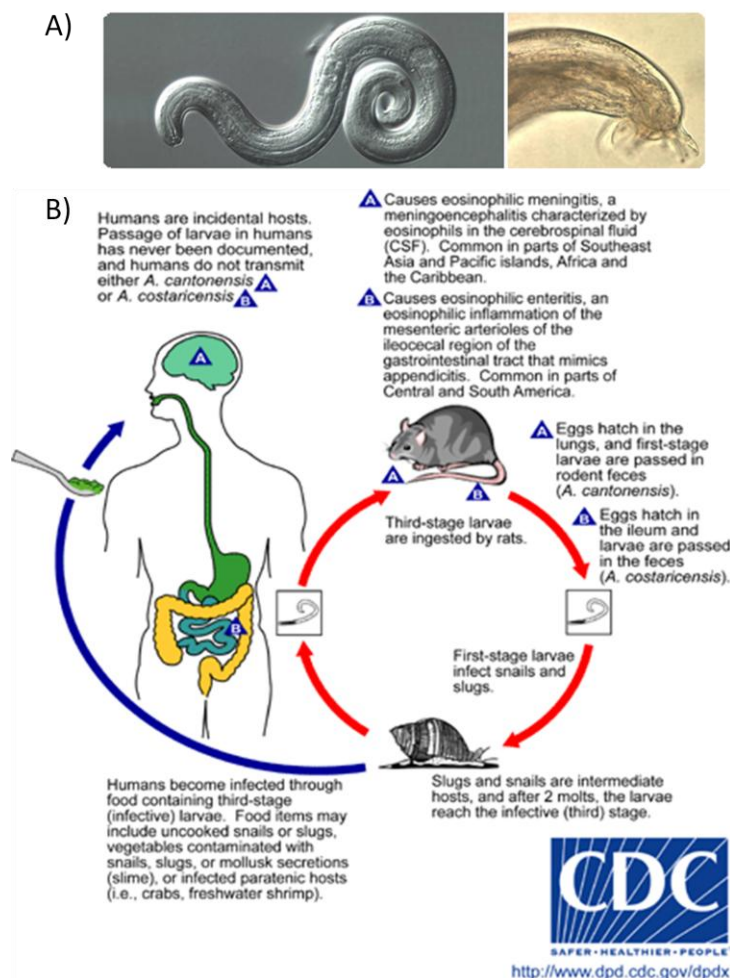


Figura 2. Imágenes de *Parastrongylus cantonensis*: A) Izq. Larva infectiva L3; Dcha. Adulto en un paciente humano. B) Ciclo biológico del parásito (obtenido de www.cdc.gov).

Parastrongylus cantonensis es endémico del sur de Asia, islas del Pacífico, Australia, algunas islas del Caribe (Puerto Rico, República Dominicana, Cuba y Jamaica) (Wang *et al.*, 2008) y EE.UU. (Kim *et al.*, 2002; Duffy *et al.*, 2004). Sin embargo, las regiones endémicas se han extendido más allá de las islas del Pacífico y el sur de Asia (Fig. 3), tal vez como resultado de la importación no intencionada de hospedadores definitivos (Wang *et al.*, 2008). La expansión de los viajes y el comercio marítimo anula las barreras geográficas a una gran cantidad de especies, lo que les permite recorrer grandes distancias en cortos periodos de tiempo. En las Islas Canarias constituye el primer hallazgo de esta especie.

islas se refieren a los nematodos *P. cantonensis* (Chen, 1935) (Foronda *et al.*, 2010) y *Trichuris muris* (Schrank, 1788) (Callejón *et al.*, 2010). El conocimiento de la distribución de las especies de hymenolepídeos resulta fundamental para determinar los riesgos potenciales para la salud humana y localizar las zonas de mayor riesgo. En muchos casos la identificación de especies requiere el uso de herramientas moleculares, lo que permite además analizar los niveles de variación y diferenciación genética, así como el flujo génico dentro y entre islas del archipiélago.

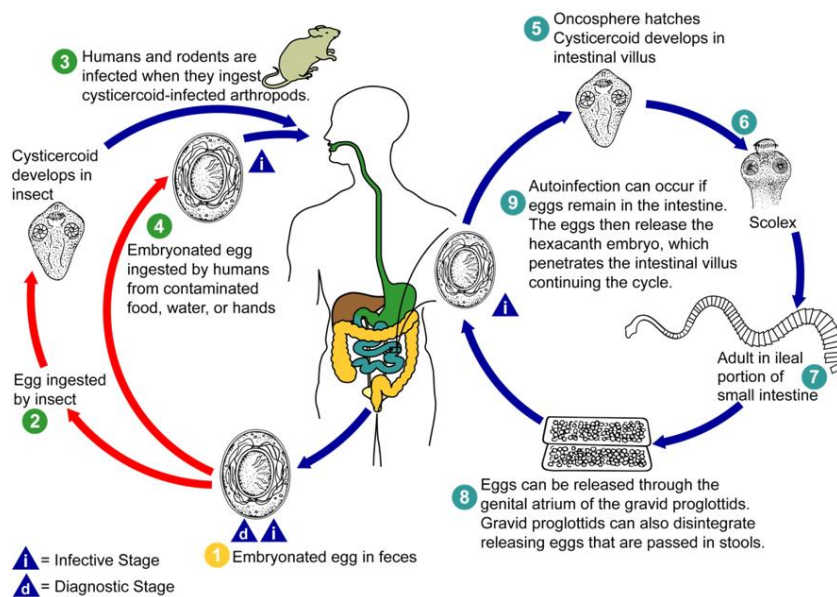


Figura 4. Ciclo biológico de *Hymenolepis* sp. (obtenido de www.cdc.gov).

1.5. Parasitofauna de murinos de El Hierro

El papel de la rata negra y el ratón doméstico en la salud pública ha sido abordado en numerosas ocasiones, por ser especies cosmopolitas que colonizan distintos tipos de hábitat y por sus tendencias peridomésticas (Cameron, 1949, Gratz, 1994, Meyer *et al.*, 1995, Battersby and Webster, 2001, Singleton *et al.*, 2003, etc). En ecosistemas aislados, la mayoría de estos estudios se han dirigido a la fauna de helmintos parásitos y al papel

potencial de los roedores como reservorios de zoonosis parasitarias (Casanova *et al.*, 1996, Miquel *et al.*, 1996, Waugh *et al.*, 2006, Milazzo *et al.*, 2010).

Sin embargo, pocos trabajos se han llevado a cabo en las zonas de alto interés ecológico, que también están sometidas a otro tipo de estrés químico antropogénico (Eira *et al.*, 2005). De ahí el interés de la isla de El Hierro, la más occidental del archipiélago y designada Reserva de la Biosfera por la UNESCO en el año 2000. Algunos estudios sobre parásitos y bacterias de *R. rattus* y *M. m. domesticus* han aportado los primeros datos de la parasitofauna de estos murinos en Canarias (p. ej. Foronda *et al.*, 2011b). La necesidad de información sobre el grado de infecciones en la naturaleza, así como sobre su importancia sanitaria y epidemiológica (Webster and Macdonald, 1995) dio lugar a un estudio multidisciplinar en el cual, además de aportar datos sobre la biodiversidad de parásitos y la biología de algunas especies de helmintos (nematodos) se analizó también la presencia de metales pesados (Cd, Pb, Hg) en los hospedadores. La información sobre sus efectos en los mamíferos silvestres es limitada, a pesar de que puede ser relevante para predecir el riesgo ambiental (Hamers *et al.*, 2006, Sánchez-Chardi *et al.*, 2007). La biovigilancia de la contaminación a través de la fauna salvaje es útil para la evaluación de la calidad del medio ambiente.

1.6. Estructura y justificación de la Tesis Doctoral

El planteamiento de esta Tesis surge esencialmente del escaso conocimiento que se posee de la fauna parasitaria de los roedores silvestres de las Islas Canarias y de la importancia que esto podría suponer desde el punto de vista de la salud pública, conociendo de antemano el importante papel de estos animales (principalmente de los Murinae) como transmisores o reservorios de muchas especies parásitas con capacidad zoonótica.

La presente Tesis Doctoral se divide en cinco apartados principales, siguiendo el formato por “Compendio de Publicaciones”. El primero de ellos trata de una introducción general al tema de Tesis seguido de una copia de cada publicación, un resumen general de los objetivos planteados y de la metodología general de la investigación, así como un resumen de los resultados obtenidos, discusión conjunta de los mismos y conclusiones finales.

En esta Tesis Doctoral se presentan los siguientes trabajos publicados:

- I. Mercedes López, Pilar Foronda, Carlos Feliu, Mariano Hernández. 2013. Genetic characterization of black rat (*Rattus rattus*) of the Canary Islands: origin and colonization. *Biological Invasions* doi 10.1007/s10530-013-0466-3.
- II. Pilar Foronda, Mercedes López-González, Jordi Miquel, Jordi Torres, Matías Segovia, Néstor Abreu-Acosta, Juan Carlos Casanova, Basilio Valladares, Santiago Mas-Coma, María Dolores Bargues, Carlos Feliu. 2010. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). *Acta Tropica* 114: 123-127.
- III. Pilar Foronda, Mercedes López-González, Mariano Hernández, Voitto Haukisalmi, Carlos Feliu. 2011. Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain). *Parasites and Vectors* 4: 185.
- IV. Carlos Feliu, Mercedes López-González, María S. Gómez, Jordi Torres, Santiago Sánchez, Jordi Miquel, Néstor Abreu-Acosta, Juan M. Segovia, Aarón Martín-Alonso, Isabel Montoliu, Mercedes Villa, Ángela Fernández-Álvarez, Abdoulaye JS Bakhom, Basilio Valladares, Jorge Orós, Pilar Foronda. 2012. Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach. *Acta Parasitologica* 57 (2): 171-178.

I. Genetic characterization of black rat (*Rattus rattus*) of the
Canary Islands: origin and colonization

Genetic characterization of black rat (*Rattus rattus*) of the Canary Islands: origin and colonization

Mercedes López · Pilar Foronda · Carlos Feliu · Mariano Hernández

Received: 28 June 2012 / Accepted: 10 April 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract In the Canary Islands two invasive rat species, *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* are present, but little is known about the origin and colonization. To this end, a molecular study was performed on *R. rattus* from the Archipelago and from the nearest continents. Partial cytochrome *b* gene sequencing offered very low levels of haplotype and nucleotide diversities, with only seven haplotypes identified. All of them belong to the European Lineage I, specifically to the “ship rat” cluster. The haplotype network showed a star-like topology. Haplotype distribution showed a genetic subdivision between eastern and central/western islands, suggesting a double colonization event. This hypothesis is congruent with historical human colonization and it is similar to that proposed for the rodent parasite *Hymenolepis diminuta*. In addition, a possible role of the Canary

Islands as a faunal link with the European and American continents is discussed.

Keywords *Rattus rattus* · Canary Islands · Cytochrome *b* · Colonization

Introduction

Rodents (especially the rat species *Rattus exulans*, *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*) may have been the most widely introduced vertebrates to accompany humans in our history of global dispersal (Drake and Hunt 2009). They are present in many regions of the world, including islands, where invasive species are the primary drivers of extinction and ecosystem change (Towns et al. 2006).


The Canary Islands consist of seven main volcanic islands and several islets, off the Atlantic coast of northwest Africa. These islands were already known to Mediterranean Classical cultures, but they were rediscovered and visited by Genovese, Majorcan, Portuguese and French sailors during the fourteenth century (Fregel et al. 2009). At that time an indigenous human population already inhabited the Canaries. According to archaeological (Onrubia-Pintado 1987) and molecular data (Rando et al. 1999; Flores et al. 2003), the oldest human settlement dates back to the first millennium BC, and most likely originated from North Africa.

M. López (✉) · P. Foronda · M. Hernández
University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico F. Sánchez s/n, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain
e-mail: merlopez@ull.edu.es

C. Feliu
Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Diagonal s/n, 08028 Barcelona, Spain

C. Feliu
Institut de Recerca de La Biodiversitat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Published online: 03 May 2013

 Springer

Today, two invasive *Rattus* species, the black rat (*R. rattus*) and the Norway rat (*R. norvegicus*) are known to occur in the Canary Islands, and several paleontological studies have documented their presence. Recent findings suggest that the introduction of *R. rattus* on Lanzarote occurred before Middle Age European contact (Rando et al. 2011) whilst *R. norvegicus* introduction is more recent, eighteenth century (Nogales et al. 2006). Multiple researches about the impacts on native biota have been published, and at present there is a notable increase in knowledge about parasitic and bacterial fauna of *Rattus*. In contrast, little is known about the origin and colonization of the Canary Islands by rats.

Over the past few years, many studies about the origin and genetic composition of black rat populations of several geographic areas around the world based on nuclear and mitochondrial DNA data have been published (for example Tollenaere et al. 2010; Bastos et al. 2011; Aplin et al. 2011).

Our aim is to describe the genetic diversity and phylogeographic patterns of the black rat in the Canaries based on cytochrome *b* (*cyt b*) partial sequences. In addition, we compare the patterns of colonization between rats and their endoparasites, given the recently published results about the distribution of cestode species on muridae from the Canary Islands (Foronda et al. 2011).

Results

Our study included *R. rattus* from Canary Islands, Europe and Africa, and *R. norvegicus* as outgroup from Canaries and Finland (Table 1). All the haplotypes obtained have been deposited in the GenBank with Accession Numbers HE820119-HE820125 for *R. rattus*, and HE820126- HE820127 for *R. norvegicus*.

Base composition of sequences obtained was comparable to *cyt b* sequences from other European murid rodents (Martin et al. 2000) with an average of 31.0 % A, 28.6 % C, 27.3 % T and 13.0 % G. The complete dataset contained 79 variable and 71 parsimony-informative sites across the 706 nts resulting in a total of 9 haplotypes. For *R. rattus*, nucleotide and haplotype diversities were very low ($\pi = 0.00118$, $h = 0.647$) (Table 1); only seven variable positions were found, three of which were parsimony-informative. Combinations of these variants resulted in seven

haplotypes (Rr1–Rr7), all of them belonging to same lineage as mentioned above.

ML and Bayesian trees of the haplotypes obtained for both species together with those of different lineages/groups found in other world regions, showed identical topology (Fig. 1). All the Canarian, European and African black rat haplotypes found in this study clustered with those belonging to “Group A” described by Tollenaere et al. (2010) and specifically to the “ship rat” cluster from the “Lineage I” (Aplin et al. 2011).

The haplotype network (Fig. 2) showed a star-like topology. In this network Rr1 haplotype occupies the central position differing from the others by a unique mutational step, except for the Rr6 haplotype found only in the Spain (Iberian Peninsula) sample, which shows three substitutions. Rr1 was present in all Canarian populations excepting Fuerteventura, and it was the unique haplotype found in Senegal, Benim and France samples. Rr2 and Rr3 haplotypes were found only in Tenerife and El Hierro samples, respectively. Haplotype Rr4 was detected in El Hierro and Lanzarote populations, being in the last population the most frequent haplotype. Finally, Rr5 was the only haplotype found in Fuerteventura and was also detected in Lanzarote and Spain, while Rr7 was found in Tunisia (Table 1; Fig. 2).

Discussion

The values of haplotype and nucleotide diversities were similar to those found in black rats from Madagascar (Hingston et al. 2005; Tollenaere et al. 2010) and South Africa (Bastos et al. 2011), in spite of the fact that these authors analyzed a longer fragment (more than 1,000 bp). The reduced diversity found in our samples agrees with the results obtained by Aplin et al. (2011) between haplotypes included in this cluster. Four of the haplotypes (Rr2, Rr4, Rr6 and Rr7) have been identified for the first time, while the others (Rr1, Rr3 and Rr5) have been previously identified in populations from other geographic regions. The Rr1 haplotype is the most frequent and widely distributed both in the Canary Islands and in the rest of the world. This haplotype has been detected in Europe and in several countries in America, Africa and Oceania, its presence in the two last continents possibly originating from Cook’s expedition, as suggested by Tollenaere et al. (2010).

Genetic characterization of black rat

Table 1 List of haplotypes and genetic diversities results for each population of *R. rattus* and *R. norvegicus* analyzed in this study

Species	Population	Site	Haplotypes (N)	<i>h</i>	π
<i>R. rattus</i>	Canary Islands	La Palma	Rr1(6)	0.00	0.0000
		El Hierro	Rr1(2), Rr3(1), Rr4(2)	0.80	0.0014
		La Gomera	Rr1(1)	–	–
		Tenerife	Rr1(9), Rr2 (2)	0.33	0.0005
		Gran Canaria	Rr1(11)	0.00	0.0000
		Fuerteventura	Rr5(12)	0.00	0.0000
		Lanzarote	Rr1(2), Rr4(10), Rr5(3)	0.53	0.0012
	Spain (Iberian Peninsula)	Sevilla	Rr1(2), Rr5(1), Rr6(1)	0.83	0.0024
	France	Banyuls-sur-Mer	Rr1(3)	0.00	0.0000
	Tunisia	Chebba	Rr1(1), Rr7(1)	1.00	0.0014
	Senegal	Dakar (Lago Rosa)	Rr1(5)	0.00	0.0000
	Benim	Cotonou	Rr1(7)	0.00	0.0000
	<i>R. norvegicus</i>	Canary Islands	La Palma	Rn2(1)	–
Tenerife			Rn1(1)	–	–
Gran Canaria			Rn1(1)	–	–
Finland			Rn1(2)	–	–

h Haplotype diversity, π nucleotide diversity

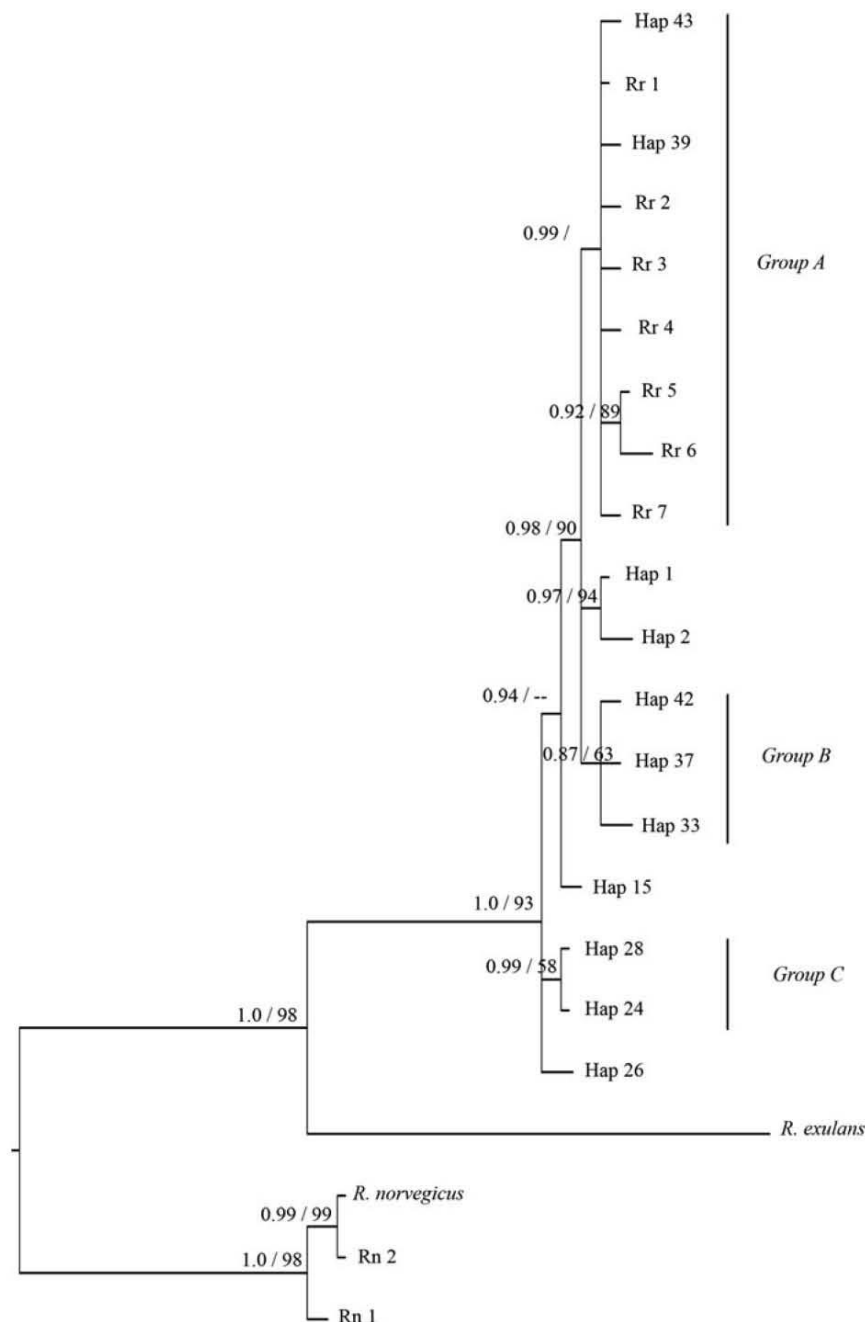
The haplotype distribution found in the Canaries (Fig. 3) was not homogeneous, the haplotypes Rr4 and Rr5 being almost exclusively confined to the easternmost islands Lanzarote and Fuerteventura. The Rr5 was the only haplotype found in Fuerteventura, and its presence in Lanzarote suggests a contact between these islands or an independent introduction to each islands. In contrast, haplotype Rr4 was present exclusively in Lanzarote. For these two eastern islands only two specimens with Rr1 haplotype have been found, specifically in Lanzarote, in a coastal area close to the main seaport, pointing to a recent introduction. Whereas, the central and western islands showed a different haplotype distribution, with the Rr2, Rr3, and the most frequent Rr1 haplotypes as a hallmark for these islands. These findings suggest a different colonization pattern of the two groups of islands (eastern and central/western) (Fig. 3).

The introduction of the rats runs parallel with human colonization in the Canary Islands. Lanzarote and Fuerteventura were the first islands visited by Europeans, which probably caused the differences between haplotypes detected in the eastern islands with respect to the western ones. Moreover, there seems to be differences between the specimens from eastern islands, Fuerteventura and Lanzarote. In the last one, the most frequent haplotype Rr4, widely distributed on

the island, has not been detected in other populations. The fact that Lanzarote was in contact with European cultures before the conquest could explain the differences found between this two islands. The presence of Rr4 haplotype in the possible Mediterranean source populations, suggested by historical data, would support this hypothesis. In contrast, the Rr5 haplotype found in Fuerteventura has been detected in the Spain samples analyzed, suggesting a later colonization of this island. These findings agree with paleontological data obtained by Rando et al. (2011), who proposed that the introduction of black rat in Lanzarote occurred before 650 AD which is prior to European contact, probably by other Mediterranean cultures such as the Romans. On the contrary, in Fuerteventura these authors dated bones with an age coincident to the islands' conquest. The presence of the Rr4 haplotype (the most frequent in Lanzarote) in the westernmost El Hierro island seems to be in contradiction with the above hypothesis. However, there is historical evidence of the "Norman" conquest of El Hierro from the easternmost islands and mainly from Viera y Clavijo (1772), which could explain this result.

The hypothesis of a double colonization of the Canary Islands has been previously suggested by Foronda et al. (2011), who recently proposed similar pattern of colonization for the rodent parasite

Fig. 1 Bayesian tree for all the *R. rattus* (Rr1–Rr7) and *R. norvegicus* (Rn1–Rn2) haplotypes analyzed in this work, together with those of different lineages/groups found in other world regions and the closely related species *R. exulans* and *R. norvegicus* (Acc. Nos. EF186433 and EF186402, respectively). Nodal support values are indicated BPP/ML. Dash indicates nodes that had support values <50 for ML. [Hap1–Hap39 and groups name follow Tollenaere et al. 2010; Hap42 and Hap43 published by Russell et al. (2011)]



Hymenolepis diminuta (Cestoda) in these islands. In that case, the haplotypes of the eastern islands were closely related and showed a high differentiation from the central/western islands.

Finally, the molecular characterization of *R. rattus* populations allowed us to detect a possible

role of the Canary Islands as a faunal link with the American and European continents. These Atlantic islands could have acted not only as a receiving population but also as a source one. The occurrence of haplotypes Rr3 in Guyana and Rr5 in Brazil and USA west coast (Aplin et al. 2011) support this

Genetic characterization of black rat

Fig. 2 Median-joining network of the 7 *R. rattus* cytochrome *b* haplotypes (706 bp). Node sizes are proportional to haplotype frequency in the whole dataset

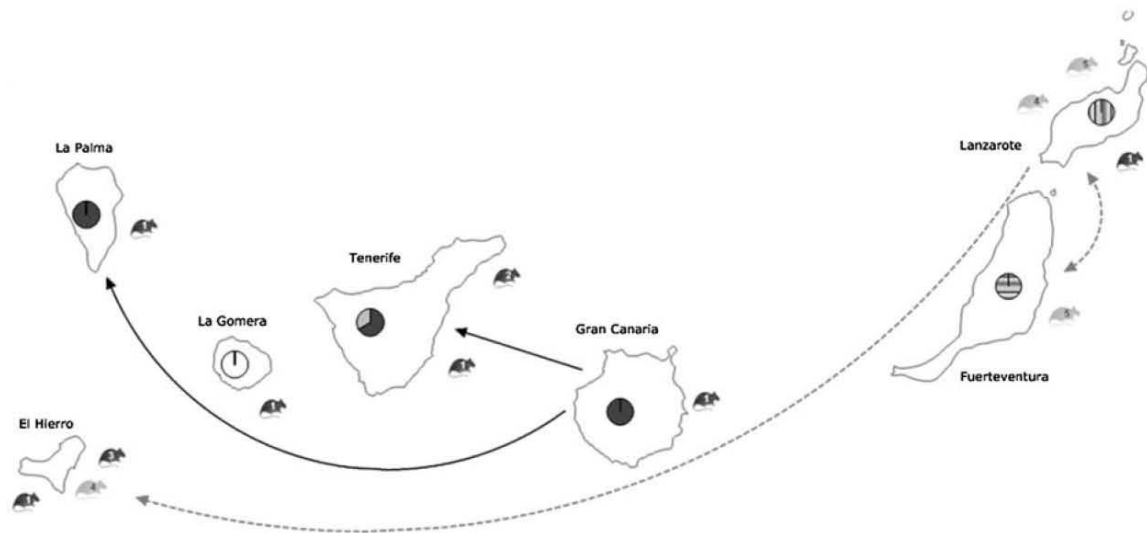
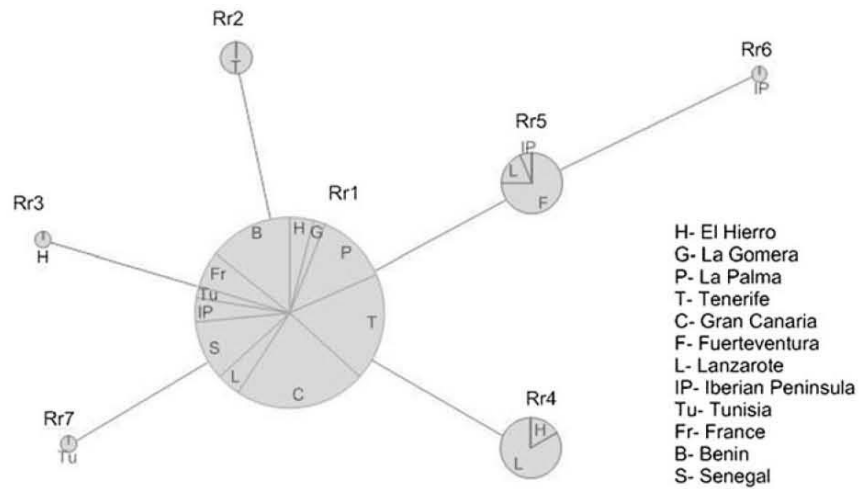


Fig. 3 Map of the Canary Islands showing the double colonization hypothesis for *Rattus rattus* and its relationship with the parasite *Hymenolepis diminuta*. The numbers in the rats indicate the *Rattus rattus* haplotype. Circles symbolize

Hymenolepis diminuta haplotypes (distribution and frequencies are based on Foronda et al. (2011)). Arrows indicate the colonization direction of *Rattus rattus*

suggestion. Their presence in America could be related to the colonization of these territories by Europeans since the sixteenth century (Bethell 1984) or to the illegal migration that took place from Canary Archipelago to Venezuela. Thus for example, during the mid-twentieth century, Guyana and Brazil acted as ports of call to this country (see González 2005). Interestingly, there are data on human transportation from the island of El Hierro to Cayenne, the capital of French Guyana (Acosta

1993). Because Rr3 is frequent in El Hierro, this relationship is highly probable. Regarding to the Rr5 haplotype, there are few records about clandestine shipments from the eastern islands that maybe link its presence in Brazil with the Canary migration.

This study provides the first molecular data on rats from Canary Islands and Spain, and adds information on their origin in the islands, from the northwestern Africa and part of Mediterranean Europe. However,

these preliminary results need exhaustive analysis, mainly of samples from the Mediterranean coast, to confirm our hypothesis.

Acknowledgments We are grateful to people who supplied us with samples: J. Miquel (Senegal and Tunisia), C. Cutillas (Spain), R. Fons (France), R. Libois (Benim) and V. Haukialmi (Finland). The final version of the manuscript was improved by comments from V. Haukialmi and V. Hernández. This paper was supported by National projects CGL 2006-04937 and CGL 2009-07759BOS, and the project 2009 SGR 403 financed by “La Generalitat de Catalunya”. Animal trapping and use was approved by the Governmental “Exmos Cabildos Insulares”.

References

- Acosta V (1993) Emigración clandestina de El Hierro a Venezuela. CCPC, Santa Cruz de Tenerife
- Aplin KP, Suzuki H, Chinen AA, Chesser RT, ten Have J et al (2011) Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of Black Rats. *PLoS ONE* 6(11):e26357. doi:10.1371/journal.pone.0026357
- Bastos AD, Nair D, Taylor PJ et al (2011) Genetic monitoring detects an overlooked cryptic species and reveals the diversity and distribution of three invasive *Rattus* congeners in South Africa. *BMC Genet* 12:26
- Bethell L (1984) The Cambridge history of Latin America Vol 2: colonial Latin America. University Press, Cambridge
- Drake DR, Hunt TL (2009) Invasive rodents on islands: integrating historical and contemporary ecology. *Biol Invasions* 11:1483–1487
- Flores C, Maca-Meyer N, Pérez JA, González AM, Larruga JM, Cabrera VM (2003) A predominant European ancestry of paternal lineages from Canary Islanders. *Ann Hum Genet* 67:138–152
- Foronda P, López-González M, Hernández M, Haukialmi V, Feliu C (2011) Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain). *Parasit Vector* 4:185–194
- Fregel R, Gomes V, Gusmão L, González AM, Cabrera VM, Amorim A, Larruga JM (2009) Demographic history of Canary Islands male gene-pool: replacement of native lineages by European. *BMC Evol Biol* 9:181
- González Antón J (2005) Fuentes hemerográficas para el conocimiento de la emigración clandestina en velero de Canarias a Venezuela a mediados del siglo XX. *Anu Am Eur* 3:291–314
- Hingston M, Goodman SM, Ganzhorn JU, Sommer S (2005) Reconstruction of the colonization of southern Madagascar by introduced *Rattus rattus*. *J Biogeogr* 32:1549–1559
- Martin Y, Gerlach G, Schlötterer C, Meyer A (2000) Molecular phylogeny of European murid rodents based on complete cytochrome *b* sequences. *Mol Phylogenet Evol* 16:37–47
- Nogales M, Rodríguez-Luengo JL, Marrero P (2006) Ecological effects and distribution of invasive non-native mammals on the Canary Islands. *Mammal Rev* 36:49–65
- Onrubia-Pintado J (1987) Les cultures préhistoriques des Îles Canaries, état de la question. *L'Anthropologie* 91:653–678
- Rando JC, Cabrera VM, Larruga JM, Hernández M, González AM, Pinto F, Bandelt HJ (1999) Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Ann Hum Genet* 63:413–428
- Rando JC, Alcover JA, Michaux J, Hutterer R, Navarro JF (2011) Late-Holocene asynchronous extinction of endemic mammals on the eastern Canary Islands. *Holocene*. doi:10.1177/0959683611430414
- Russell JC, Gleeson DM, Le Corre M (2011) The origin of *Rattus rattus* on the Îles Éparses, Western Indian Ocean. *J Biogeogr* 38:1834–1839
- Tollenaere C, Brouat C, Duplantier J-M et al (2010) Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *J Biogeogr* 37:398–410
- Towns DR, Atkinson IAE, Daugherty CH (2006) Have the harmful effects of introduced rats on islands been exaggerated? *Biol Invasions* 8:863–891
- Viera Y Clavijo, J (1772) Historia de la Islas Canarias. Vol 1. Cupsa, Madrid

II. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain)



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain)

Pilar Foronda^{a,*}, Mercedes López-González^a, Jordi Miquel^b, Jordi Torres^b, Matías Segovia^b, Néstor Abreu-Acosta^c, Juan Carlos Casanova^b, Basilio Valladares^a, Santiago Mas-Coma^d, María Dolores Bargues^d, Carlos Feliu^b

^a Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, 38203 Tenerife, Canary Islands, Spain

^b Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Diagonal s/n, 08028 Barcelona, Spain

^c Department of Animal Biology, University of La Laguna, Avda. Fco. Sánchez s/n, 38203 Tenerife, Canary Islands, Spain

^d Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Ave. Vicent Andres Estelles S-N, E-46100 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2009

Received in revised form 1 February 2010

Accepted 3 February 2010

Available online 11 February 2010

Keywords:

Parastrongylus cantonensis

Parastrongylus dujardini

Rattus rattus

ITS-2

SSU rRNA

Canary Islands

ABSTRACT

Parastrongylus cantonensis is a parasite of murid rodents that can infect humans and cause health problems as eosinophilic meningitis. Although it is endemic in south Asia, the Pacific islands, Australia, USA, and a few Caribbean islands, it has been extended to new geographical regions. In the Canary Islands (Spain) a survey of helminths of *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus* was carried out. Furthermore, five species of molluscs were examined for nematode larvae to determine whether they are potential intermediate hosts of *P. cantonensis*. Nematodes were found in the lungs of 15% of 67 *R. rattus* examined in Tenerife, one of the four studied islands, with a prevalence of 20% in the highest focus of infection. Based on morphological and molecular analysis, with the complete internal transcribed spacer 2 (ITS-2) and a fragment of the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) nucleotide sequences, nematodes were identified as *P. cantonensis*. Larval nematodes found from snails and slugs were identified as third-stage (L₃) Metastrongyloidea, but the molecular study showed that they did not belong to *P. cantonensis*. This is the first finding of angiostrongyliasis in rats in the Canary Islands (Spain). New molecular data for this species and *Parastrongylus dujardini* are reported. The presence of *P. cantonensis* in Tenerife could be of importance from the public health point of view. Further studies are required in order to look for other potential foci of infections in the Canary Islands.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parastrongylus cantonensis (syn. *Angiostrongylus cantonensis*) (Chen, 1935) (Nematoda: Angiostrongylidae) is a lung dwelling parasite of murid rodents (*Rattus*, *Bandicota*, *Melomys*) (Soulsby, 1982; Acha and Szyfres, 2003). This nematode may use man as an incidental host, causing serious health problems such as eosinophilic meningitis (Alicata, 1988; Acha and Szyfres, 2003), the major clinical feature of *P. cantonensis* infection in humans. Rats are definitive hosts of *P. cantonensis*, a wide variety of molluscs are intermediate hosts, and crustaceans, predacious land planarians, frogs, and monitor lizards are paratenic hosts (Wang et al., 2008). Human

beings acquire *P. cantonensis* by ingesting third-stage larvae (L₃) in intermediate or paratenic hosts, or on contaminated vegetables.

Parastrongylus cantonensis is endemic in south Asia, the Pacific islands, Australia, a few Caribbean islands (Puerto Rico, Dominican Republic, Cuba and Jamaica) (Wang et al., 2008), and USA (Kim et al., 2002; Duffy et al., 2004), and it is considered an emerging infectious disease in Mainland China (Lv et al., 2009). However, endemic regions have now extended beyond the Pacific islands and south Asia, perhaps as a result of the unintended import of definitive rodent hosts (Wang et al., 2008). The expansion of global air travel and seaborne trade overcomes geographic barriers to a lot of species, enabling them to move great distances in short periods of time.

This is the first finding of *P. cantonensis* in the Canary Islands (Spain). New molecular data for this species and for *Parastrongylus dujardini* (Drozd and Doby, 1970), a common species in murid rodents from the Iberian Peninsula (Feliu et al., 1997) are reported. Moreover, the results confirm the spread of *P. cantonensis* across

* Corresponding author at: University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, 38203 Tenerife, Canary Islands, Spain. Tel.: +34 922 318484; fax: +34 922 318514.

E-mail addresses: pforonda@ull.es, pilarforonda@gmail.com (P. Foronda).

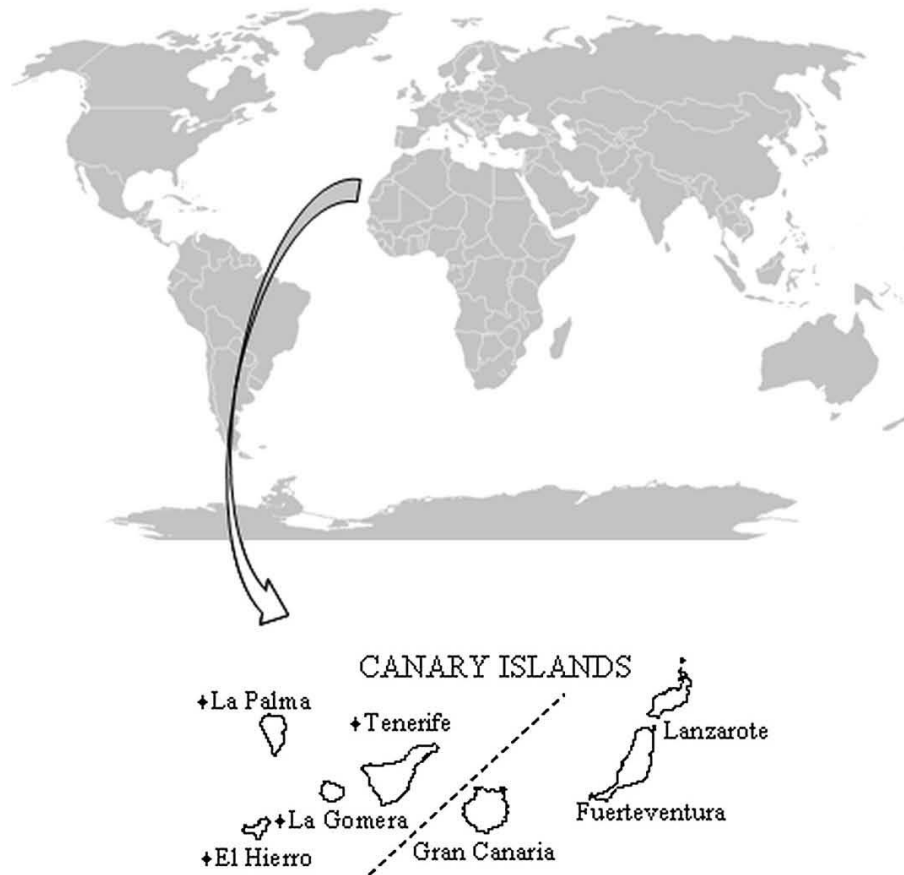


Fig. 1. Location of the Canary Islands (♦, studied islands).

the Atlantic Ocean (Aguilar et al., 1981; Garcia and Bruckner, 1997; Acha and Szyfres, 2003; Chikweto et al., 2009).

2. Materials and methods

A total of 358 rodents were captured using live-capture traps for the helminthological study in four of the Canary Islands (Spain). 67 *R. rattus* (Linnaeus, 1758), six *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and 76 *Mus musculus domesticus* (Linnaeus, 1758) were captured in Tenerife; 14 *R. rattus*, two *R. norvegicus* and 80 *M. m. domesticus* from La Palma; 12 *R. rattus* and 21 *M. m. domesticus* from La Gomera; and 19 *R. rattus* and 61 *M. m. domesticus* from El Hierro (Fig. 1). The animals were scarified by cervical dislocation in the laboratories of the Institute University of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands.

The nematode specimens were collected and processed for morphological and molecular analysis. All material was preserved in 70% ethanol for morphological study, and 100% ethanol or frozen at -80°C for DNA extraction. The nematodes were clarified with Amman lactophenol and studied morphologically and morphometrically with the use of a light microscope. Morphological identification of the adult nematodes was based on Chen (1935), Kinsella (1971), Drozd et al. (1975), and Ubelaker (1986).

A total of 53 land snails belonging to *Hemicycla bidentalis* (Lamarck, 1821) (34), *Retinella circumessa* (Shuttleworth, 1852) (7), and *Helix* sp. (2); and 17 slugs belonging to *Lehmannia valen-*

tiana (Ferussac, 1823) (2), and *Phutonia lamarckii* (Ferussac, 1821) (15) were collected in the habitat where *P. cantonensis* was found. These molluscs were dissected and examined by a binocular microscope for nematode larval infection. Fixed and living larvae were studied microscopically using a Leitz Laborlux K microscope.

Adult and larval nematodes were studied using molecular methods. In addition, two specimens of *P. dujardini* detected in *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758) (Muridae) from Pyrenean Mountains (Natural Reserve of Py, France) were analyzed.

Total genomic DNA was extracted for nematodes using the Fast DNA (BIO 101 Systems) kit, following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was stored at 4°C . The internal transcribed spacer 2 (ITS-2) complete region was amplified with the primers NC1 5'-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3' and NC2 5'-TTAGTTCTTTTCTCCGCT-3', previously described by Gasser et al. (1993). PCR amplifications were performed in a total volume of 50 μl , including 10 \times buffer (Bioline, London), 1 μl of each dNTP (10 mM), 1 μl of each primer (12.5 ng/ml), 0.2 μl of Biotaq polymerase (5 U/ml) (Bioline, London), 1.5 mM MgCl_2 , and 20 ng of total genomic DNA. PCR conditions were as follows: 2 min at 94°C followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, with a final extra extension step at 72°C for 5 min.

An additional fragment of a nuclear gene, the small subunit ribosomal RNA gene (SSU rRNA), was amplified using primers SSU.F07 5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3' and SSU.R09 5'-AGCTGGAATTACCGCGTCTG-3' (Blaxter et al., 1998). For this region

the conditions were: 94°C for 2 min and 38 cycles of 94°C for 30 s, 45°C for 30 s and 65°C for 1 min.

The amplifications were carried out in a MyCycler thermocycler (Biorad, CA). Amplification products were analyzed on 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. PCR products were purified using UltraClean PCR Clean-up kit (MO BIO, Carlsbad, CA). Sequencing reactions were performed for both strands and sequenced on an ABI PRISM 3770 DNA Analyzer (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions.

To elucidate any similarities in sequences with previously published in GenBank, a BLAST search (WUBLAST) was carried out. Supplemental *Angiostrongylus* sequences were obtained from GenBank: *Parastrongylus costaricensis* (DQ028989 and DQ028990), *Angiostrongylus vasorum* (DQ627595 and DQ627596), and *Angiostrongylus cantonensis* (EU636007 and EU636008). New and published sequences were aligned with the multiple alignment program ClustalW in Mega 3.1 (Kumar et al., 2004) and minor corrections were made by hand, in order to increase the aligned sequence similarity and improve inferences on positional homology. Positions corresponding to regions of uncertain alignment were always excluded from the analysis.

Phylogenetic relationships based on 322 bp region of the ITS-2 gene were inferred using the neighbor-joining distance (NJ) method, with the Mega 3.1 software program. At least 1000 bootstrap replicates were used to infer statistical support at branch nodes.

χ^2 -test was used to determine statistical differences in the prevalence of *P. cantonensis* between seasons.

3. Results

Morphological identification was based on 20 males and 20 females. The species was identified as *P. cantonensis* (measurements in μ m except for the body length) (mean in parentheses): males, body length 17–20 mm (18.4), maximum width 279–412 (359), oesophagus length 280–346 (308), oesophagus maximum width 55–80 (62), spicules length 1071–1224 (1135), gubernaculum length 88–140 (118), caudal bursa diameter 243–250 (246); females, length 27–30 mm (28), maximum width 473–504 (490), oesophagus length 326–408 (348), oesophagus maximum width 55–80 (66); distance vulva-posterior end of body 257–306 (285), distance anus-posterior end of body 50–65 (59), vulva region width 183–224 (205), anus region width 52–88 (74), vagina length 126–176 (151); eggs 37–63 \times 25–45 (54.71 \times 32.42).

PCR amplification of the ITS-2 yielded fragments of 625 bp for *P. cantonensis* from Tenerife and 508 bp for *P. dujardini* from the Pyrenean Mountains. The fragment of the SSUrRNA of *P. cantonensis* was 527 bp. Sequences for *P. cantonensis* were deposited in the GenBank database under accession nos. **GQ181112** for ITS-2 and **GQ181114** for the SSU rRNA. ITS-2 sequence for *P. dujardini* isolate from the Pyrenean Mountains was deposited under accession no. **GQ181113**.

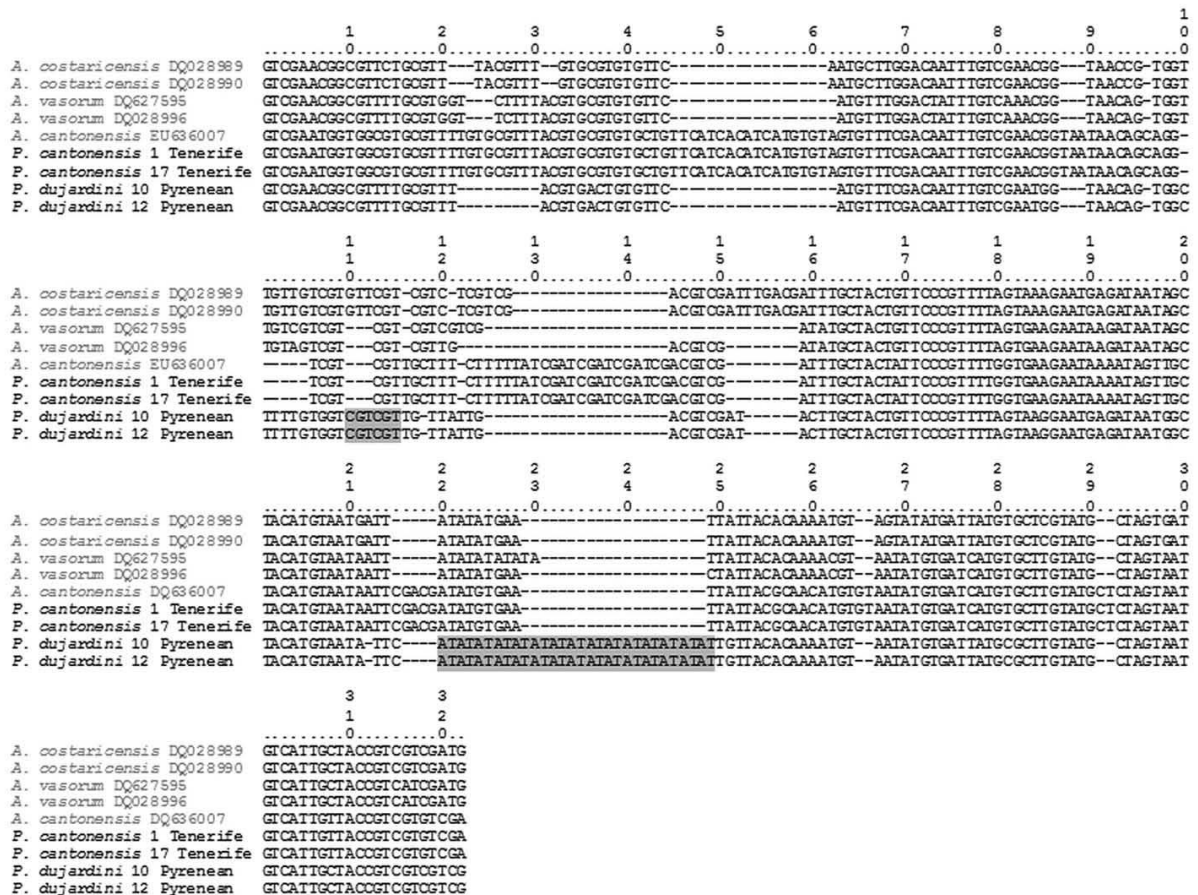


Fig. 2. Alignment of a 322 bp region of the ITS-2 sequences of *Parastrongylus cantonensis* isolates from Tenerife and *P. dujardini* from Pyrenean Mountains (shown in black), along with *A. cantonensis*, *A. costaricensis* and *A. vasorum* from the GenBank (shown in grey). Microsatellites of *P. dujardini* are highlighted.

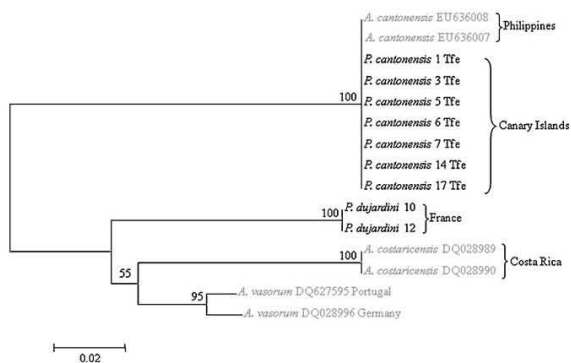


Fig. 3. Phylogenetic tree constructed with ITS-2 sequences, inferred using the neighbor-joining method. Numbers in branches represent bootstrap percentages of 1000 replicates. New sequences from this study are shown in black.

When the sequences of the samples from Canary Islands were compared, there were no variable positions between them, showing a single unique haplotype.

After performing a BLAST search with the obtained sequences of the nematodes from Tenerife, all the ITS-2 sequences clustered with *A. cantonensis* from the Philippines (GenBank accession nos. EU636007 and EU636008), with 98% BLAST identity, and 99% identity with SSUrRNA of *A. cantonensis* from a laboratory specimen of *R. norvegicus* (GenBank accession no. AY295804.1) were revealed.

The alignment of *P. cantonensis* from Tenerife with *A. cantonensis* of the GenBank presented only two variable positions, both parsimony informative. However, it was very different from the other species, *P. dujardini*, *P. costaricensis*, and *A. vasorum* (Fig. 2).

The alignment of the ITS-2 sequences of *P. dujardini* with *P. cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum* and *P. costaricensis* for a fragment of 322 bp, similar to that used by Jefferies et al. (2009), revealed the presence of two microsatellites (CGT)₂ and (AT)₁₅ in *P. dujardini* (Fig. 2).

The phylogenetic tree grouped the individuals of *P. cantonensis* from the Canary Islands with the Philippines ones. The two isolates of *P. dujardini* formed a different clade separate from the other species of *Parastrongylus*, supported by high bootstrap value (100%) (Fig. 3).

Parastrongylus cantonensis was found only in one of the four studied islands (Tenerife). The overall prevalence in this island was 15% for *R. rattus* (10/67). None of the *R. norvegicus* or *M. m. domesticus* was infected. All the positive rats were located in the North East of Tenerife (Fig. 4), being absent in the rest of the study sites.

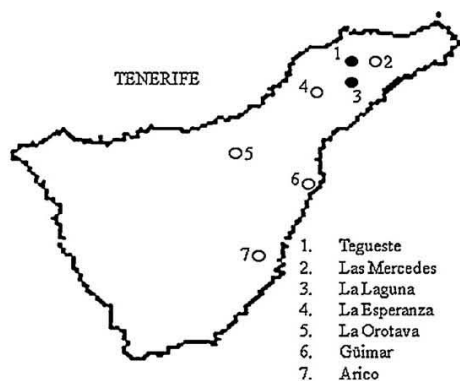


Fig. 4. Location of the studied places in Tenerife (shown in black: focus of *P. cantonensis*).

Rats from Tegueste showed the highest prevalence, 20% (9/44). The only other rat parasitized with this nematode was detected near this focus, in La Laguna being 7% (1/14) in this locality. The mean intensity of *P. cantonensis* in infected hosts was 12.5, and the range 1–30. The prevalence of *P. cantonensis* in the infected area was significantly higher in winter (44%) than in summer (5%) ($\chi^2 = 10.5$; $P < 0.05$).

Two of the five species of molluscs, *H. bidentalis* and *P. lamarkii*, were infected with larval nematodes, with a prevalence of 12% and 47%, respectively. These were identified as third-stage (L₃) metastrongyloid larvae after Anderson (2000), with the typical characters, specifically the strongyloid oesophagus, the buccal capsule posterior to the mouth, and the free living L₃ larvae. The ITS-2 PCR products obtained from the larvae was ca. 300 bp. None of the larvae were a match for *P. cantonensis*.

4. Discussion

Morphological studies were carried out to identify *Parastrongylus* spp. in the Canary Islands. The length of the spicules, higher than 1000 μm , is an important differentiating character for *P. cantonensis*. Molecular analysis using two distinct regions of DNA; the ITS-2 (Caldeira et al., 2003) and the SSU rRNA (Fontanilla and Wade, 2008) was carried out to confirm the morphological results. This is the first report of angiostrongyliasis in the Canary Islands, hence the global distribution of *P. cantonensis* must be revised to include this area with rats as a definitive host.

Helminths can be carried together with their host when they are introduced in new regions (Ramalho et al., 2009). According to Wang et al. (2008), rats are necessary for the establishment of *P. cantonensis* foci. In the Canary Islands, both *R. rattus* and *R. norvegicus* have been introduced in the Archipelago and are distributed throughout the islands (Martín et al., 2000). Hence, it is probable that the spread of this nematode to the Canary Islands has taken place with the introduction of rats. Nevertheless, it is peculiar that *P. cantonensis* has been detected only in Tenerife. The helminth richness in an island is related to its size which could explain why *P. cantonensis* was only found in the largest of the studied islands.

The focus of the infection was detected in Tegueste, an area characterized by laurel forests and farming close to the village of La Laguna. Climatic conditions, such as the temperature (see Lv et al., 2006) and precipitation could be important factors determining the present distribution of *P. cantonensis* in Tenerife. However, other environmental and biological factors may also affect the distribution of the parasite.

The fact that *R. rattus* was the only species found infected with *P. cantonensis* is not surprising, taking into account that *R. norvegicus* was not present in the focus, and *M. m. domesticus* has never been cited as a host for this parasite.

The infection rates of *P. cantonensis* in definitive hosts in endemic regions are highly variable (from 3% to 100%) (Wang et al., 2008). In the case of Tenerife, the most important focus has a high prevalence, similar to regions such as Zhejiang (China) (21%) (Lin and Wang, 2004; Wu, 2006), Indonesia (29%) (Carney et al., 1978), New Orleans (USA) (21%) (Campbell and Little, 1988), Jamaica (27%) (Lindo et al., 2002), and Haiti (21%) (Raccurt et al., 2003). This finding is of relevance since this is a new contribution to the distribution on islands, in addition to the Pacific and Caribbean islands (Wang et al., 2008).

In certain regions, only one or two species of snails or slugs are the main intermediate hosts. For example, the giant African snail *Achatina fulica* is the major source of infection worldwide (Kliks and Palumbo, 1992). The dispersal of *P. cantonensis* was associated with the spread of this snail from its native origin in Africa throughout

the Pacific islands and South Africa (Kliks and Palumbo, 1992). To the present, *A. fulica* has not been found in the Canary Islands, but other invertebrate species could act as intermediate or paratenic hosts, since most species of molluscs are susceptible to and capable of transmitting *P. cantonensis* (Cross and Chen, 2007; Ibrahim, 2007; Lv et al., 2008).

In order to determine the potential intermediate hosts in Tenerife, five molluscs species were examined from the infected area. The two molluscs species with nematode larval infections are endemic to Tenerife (Izquierdo et al., 2004). However, the molecular results showed that the ITS-2 PCR product from larvae from molluscs does not belong to *P. cantonensis* (Caldeira et al., 2003).

The significant differences observed between winter and summer could be due to the high temperature and low humidity in summer contrasting with high levels of rainfall in winter. According to Lv et al. (2006), the sum of environmental and biological factors may determine the critical conditions required for the parasite and its intermediate hosts to survive.

The presence of *P. cantonensis* in Tenerife could be of importance from the public health point of view, since it causes eosinophilic meningitis or neurologic angiostrongyliasis (Kliks and Palumbo, 1992; Senanayake et al., 2003). For this reason, preventive methods must be considered in order to avoid the transmission of infective larvae by invertebrates or vegetables. Health education, rigorous food inspection and surveillance are all needed to prevent potential angiostrongyliasis outbreaks. Also, further investigations in other areas are required, in order to determine the distribution of this potentially zoonotic species. Furthermore, possible accidental hosts living in the infected area, wild rabbits, cows, sheep, etc., should be studied. This may allow the detection of new foci and potential transmission sites of *P. cantonensis*.

Acknowledgements

This work was supported by projects CGL 2006-04937, CGL2009-07759 and RD06/0021/0005. We thank to "Excmos. Cabildos Insulares" of Tenerife, La Palma, La Gomera and El Hierro.

References

- Acha, P.N., Szyfres, B., 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. 3rd ed. Pan American Health Organization, 395 pp.
- Aguilar, P.H., Morera, P., Pascual, J., 1981. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 963–965.
- Alicata, J.E., 1988. *Angiostrongylus cantonensis* (eosinophilic meningitis): historical events in its recognition as a new parasitic disease of man. *J. Wash. Acad. Sci.* 78, 38–46.
- Anderson, R.C., 2000. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission, 2nd ed. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liuk, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vidal, J.T., Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71–75.
- Caldeira, R.L., Carvalho, O.S., Mendoza, C.L.F.G., Graeff-Teixeira, C., Silva, M.C.F., Ben, R., Maurer, R., Lima, W.S., Lenzi, H.L., 2003. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 1039–1043.
- Campbell, B.G., Little, M.D., 1988. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38, 568–573.
- Carney, W.P., Stafford, E.E., Purnomo, Tanudjaja, S., 1978. *Angiostrongylus* in Indonesia: additional geographic and host occurrence records. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 9, 516–519.
- Chen, H.T., 1935. Un nouveau nematode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis*, n. g., n. sp. des rats de Canton. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 13, 312–317.
- Chikweto, A., Bhajyat, M.I., Macpherson, C.N., Deallie, C., Pinckney, R.D., Richards, C., Sharma, R.N., 2009. Existence of *Angiostrongylus cantonensis* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. *Vet. Parasitol.* 162, 160–162.
- Cross, J.H., Chen, E.R., 2007. *Angiostrongylus*. In: Murrell, K.D., Fried, B. (Eds.), *Food Borne Parasitic Zoonoses*. Springer, New York, pp. 263–290.
- Drozd, J., Gorecka, T., Binh, N.H., 1975. The occurrence of nematodes of the subfamily *Angiostrongylinae* in Viet-Nam and the question of geographical origin of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935). *Acta Parasitol. Pol.* 23, 115–126.
- Duffy, M.S., Miller, C.L., Kinsella, J.M., de Lahunta, A., 2004. *Parastrongylus cantonensis* in a nonhuman primate, Florida. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 2207–2210.
- Feliu, C., Renaud, F., Catzeflis, F., Hugot, J.P., Durand, P., Morand, S., 1997. A comparative analysis of parasite species richness of Iberian rodents. *Parasitology* 115, 453–466.
- Fontanilla, I.A.C., Wade, C.M., 2008. The small subunit (SSU) ribosomal (r) RNA gene as a genetic marker for identifying infective 3rd juvenile stage *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop.* 105, 181–186.
- Garcia, I.S., Bruckner, D.A., 1997. *Diagnostic Medical Parasitology*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Beveridge, I., 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res.* 21, 2525–2526.
- Ibrahim, M.M., 2007. Prevalence and intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in freshwater snails in relation to some ecological and biological factors. *Parasite* 14, 61–70.
- Izquierdo, I., Martín, J.L., Zurita, N., Arechavaleta, M., 2004. Lista de especies silvestres de Canarias (Hongos, Plantas y Animales Terrestres) 2004. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias, La Laguna, 500 pp.
- Jefferies, R., Shaw, S.E., Viney, M.E., Morgan, E.R., 2009. *Angiostrongylus vasorum* from South America and Europe represent distinct lineages. *Parasitology* 136, 107–115.
- Kim, D.Y., Stewart, T.B., Bauer, R.W., Mitchell, M., 2002. *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* now endemic in Louisiana wildlife. *J. Parasitol.* 88, 1024–1026.
- Kinsella, J.M., 1971. *Angiostrongylus schmidtii* sp. n. (Nematoda: Metastrongyloidea) from the rice rat, *Oryzomys palustris*, in Florida, with a key to the species of *Angiostrongylus* Kamensky, 1905. *J. Parasitol.* 57, 494–497.
- Kliks, M.M., Palumbo, N.E., 1992. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. *Soc. Sci. Med.* 34, 199–212.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Lin, W., Wang, X.T., 2004. Epidemiology of *Angiostrongylus cantonensis* in mainland. *Chin. J. Zoonoses* 20, 1004–1007.
- Lindo, J.F., Waugh, C., Hall, J., Cunningham-Myrie, C., Ashley, D., Eberhard, M.L., Sullivan, J.J., Bishop, H.S., Robinson, D.G., Holtz, T., Robinson, R.D., 2002. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 324–326.
- Lv, S., Zhou, X.N., Zhang, Y., Liu, H.X., Zhu, D., Yin, W.G., Steinmann, P., Wang, X.H., Jia, T.W., 2006. The effect of temperature on the development of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) in *Pomacea canaliculata* (Lamarck 1822). *Parasitol. Res.* 99, 583–587.
- Lv, S., Zhang, Y., Steinmann, P., Zhou, X.N., 2008. Emerging angiostrongyliasis in Mainland China. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 161–164.
- Lv, S., Zhang, Y., Liu, H.X., Hu, L., Yang, K., Steinmann, P., Chen, Z., Wang, L.Y., Utzinger, J., Zhou, X.N., 2009. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e368.
- Martín, A., Hernández, M.A., Lorenzo, J.A., Nogales, M., González, C., 2000. Las palomas endémicas de Canarias. Viceconsejería de Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. SEO/BirdLife.
- Raccut, C.P., Blaise, J., Durette-Desset, M.C., 2003. Presence of *Angiostrongylus cantonensis* in Haiti. *Trop. Med. Int. Health* 8, 423–426.
- Ramalho, A.C., da Silva, R.J., Schwartz, H., Pêres, A.K., 2009. Helminths from an introduced species (*Tupinambis merianae*), and two endemic species (*Trachylepis atlantica* and *Amphisbaena ridleyi*) from Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *J. Parasitol.* 13, 1.
- Senanayake, S.N., Pryor, D.S., Walker, J., Konecny, P., 2003. First report of human angiostrongyliasis acquired in Sydney. *Med. J. Aust.* 179, 430–431.
- Soulsby, E.J.L., 1982. *Angiostrongylus cantonensis*. In: London (Ed.), *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. Bailliere Tindall Publishers, London, pp. 280–281.
- Ubelaker, J.E., 1986. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. *J. Parasitol.* 72, 237–244.
- Wang, Q.P., Lai, D.H., Zhu, X.Q., Chen, X.G., Lun, Z.R., 2008. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect. Dis.* 8, 621–630.
- Wu, G.H., 2006. *Angiostrongylus cantonensis*. In: Tang, J.Q. (Ed.), *Nature-borne Diseases*. Science Press, Beijing, pp. 1182–1189.

III. Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes
in murid rodents on the Canary Islands (Spain)

RESEARCH

Open Access

Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain)

Pilar Foronda^{1*}, Mercedes López-González¹, Mariano Hernández¹, Voitto Haukisalmi² and Carlos Feliu³

Abstract

Background: In the Canary Islands there are no previous data about tapeworms (Cestoda) of rodents. In order to identify the hymenolepidid species present in these hosts, a survey of 1,017 murine (349 *Rattus rattus*, 13 *Rattus norvegicus* and 655 *Mus musculus domesticus*) was carried out in the whole Archipelago. Molecular studies based on nuclear *ITS1* and mitochondrial *COI* loci were performed to confirm the identifications and to analyse the levels of genetic variation and differentiation.

Results: Three species of hymenolepidids were identified: *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis microstoma* and *Rodentolepis fraterna*. *Hymenolepis diminuta* (in rats) and *R. microstoma* (in mice) showed a widespread distribution in the Archipelago, and *R. fraterna* was the least spread species, appearing only on five of the islands. The hymenolepidids found on Fuerteventura, Lanzarote and La Graciosa were restricted to one area. The *COI* network of *H. diminuta* showed that the haplotypes from Lanzarote and Fuerteventura are the most distant with respect to the other islands, but clearly related among them.

Conclusions: Founder effects and biotic and abiotic factors could have played important role in the presence/absence of the hymenolepidid species in determined locations. The haplotypes from the eastern islands (Fuerteventura and Lanzarote) seem to have shared an ancestral haplotype very distant from the most frequent one that was found in the rest of the islands. Two colonization events or a single event with subsequent isolation and reduced gene flow between western-central and eastern islands, have taken place in the Archipelago. The three tapeworms detected are zoonotic species, and their presence among rodents from this Archipelago suggests a potential health risk to human via environmental contamination in high risk areas. However, the relatively low prevalence of infestations detected and the focal distribution of some of these species on certain islands reduce the general transmission risk to human.

Background

Cestodes of the family Hymenolepididae (Cyclophyllidae) are ubiquitous and parasites from diverse birds, rodents, insectivores, Chiroptera and some other mammals. According to Czaplinski and Vaucher [1], there are ca. 230 and 620 species of hymenolepidids parasitizing mammals and birds, respectively. Some of the hymenolepidid species of rodents are of health interest, since they are zoonotic and can cause severe diseases in immunosuppressed individuals [2-4].

The Canary Islands are considered a “hot spot” of biodiversity and endemism of species, including helminths [5]. However, the murid rodents *Rattus rattus* (L., 1758), *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and *Mus musculus domesticus* L., 1758 have been introduced to the Canary Islands.

The Canarian Archipelago is of volcanic origin, and it is comprised of seven main islands and several islets (Figure 1). The climate varies according to altitude of the islands. Mean temperature and annual precipitation range from about 21°C and 100-300 mm, respectively, in coastal zones, to about 9°C and 500-800 mm, respectively, at higher altitudes. The vegetation is distributed as a function of altitude and orientation. The eastern

* Correspondence: pforonda@ulles

¹Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, 38203 Tenerife, Canary Islands, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

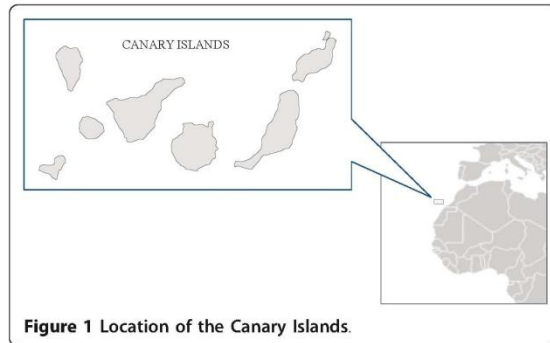


Figure 1 Location of the Canary Islands.

islands and the lowlands of the higher central and western islands are characterized by dry xerophytic shrub. Temperate forest is located at 300-500 m a.s.l., and the most humid habitat, laurel forest, appears between 550-1300m. A pine forest is the next higher in altitude (1300-2000m) and from here the habitat is constituted by scattered leguminous shrubs.

At present, there is no information about the tapeworms (Cestoda) of rodents on the Canary Islands. The only existing studies on helminths of rodents on these islands concern the nematodes *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) and *Trichuris muris* (Schrank, 1788) [6,7]. In order to identify the hymenolepidid species present in rodents on the Canary Islands, a survey was carried out in the whole Archipelago. The analyses of the distribution of each hymenolepidid species may be used to determine the potential health risks for humans, and to locate the highest risk areas. Furthermore, molecular studies based on nuclear and mitochondrial loci, were performed for hymenolepidid cestodes to confirm the identifications and to analyse the levels of genetic variation and differentiation, given the degree of isolation of the Archipelago with respect to the mainland.

Methods

The study was carried out on the Canary Islands, located 100 km off the NW coast of Africa, between 13° 23' and 18° 8' W and 27° 37' and 29° 24' N (Figure 1). Since 2007 to 2011, a total of 1,017 murine rodents (349 *R. rattus*, 13 *R. norvegicus* and 655 *M. m. domesticus*) (Table 1) were captured using live-traps on all the islands and on a small islet. The animals were sacrificed by cervical dislocation or with CO₂.

The obtained cestode specimens were preserved in 70% ethanol for morphological study and in 100% ethanol or frozen at -80°C for DNA extraction. Cestodes were stained in ferro-acetic carmine, mounted in Canada balsam and studied morphologically and morphometrically with the use of a light microscope. Morphological identification of hymenolepidid cestodes was

based on Czaplinski and Vaucher [1]. *Rodentolepis straminea* (Goeze, 1882) from *Apodemus sylvaticus* (L., 1758) from the Pyrenees (France) was also analyzed. Statistical χ^2 test with one degree of freedom was used to determine differences in the prevalence of the hymenolepidid species between islands.

Molecular analyses

Total genomic DNA was extracted for hymenolepidid cestodes using the Fast DNA (BIO 101 Systems) kit, following the manufacturer's instructions and the obtained DNA stored at 4°C. The nuclear internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) region was amplified with the primers F3 5'GCGGAAGGATCATTACAGTTC 3' and R3 5'GCTCGACTCTTCATCGATCCACG 3', previously designed by Macnish *et al.* [8]. PCR amplifications were performed in a total volume of 50 μ l, containing 1X buffer (Bioline, London), 0.2 mM of each dNTP, 1 μ M of each primer, 1U of Taq DNA polymerase (Bioline, London), 1.5 mM MgCl₂, and 20 ng of total genomic DNA. PCR conditions were as follow: 2 min at 94°C followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 20 sec, annealing at 56°C for 20 sec, and extension at 72°C for 30 sec, with a final extra extension step at 72°C for 5 min.

The mitochondrial cytochrome oxidase 1 (*COI*) gene was amplified in two overlapping fragments with primers FCOI 5' TTGAATTTGCCACGTTTGAATGC 3' and RCOI 5' GAACCTAACGACATAACATAATGA 3' [9] and HyCF 5' TATGTTAGACTGAGTGTTTTC 3' and HyCR 5' TAATACATAAACCTCGGGATG 3', designed by us for this study based on the consensus sequence between different species. For these regions the amplification conditions were: 94°C for 2 min and 35 cycles of 94°C for 20 sec, 52°C for 20 sec and 72°C for 30 sec, and 72°C for 5 min as the final extension.

The amplifications were carried out in a Labnet thermocycler (Labnet International, Inc). Amplification products were analyzed on 1.7% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. PCR products were purified using UltraClean PCR Clean-up kit (MO BIO, Carlsbad, CA). Purified PCR products were sequenced at Macrogen Inc. (Korea) and the Genomic Service of the University of La Laguna.

To elucidate any similarities in sequences with those previously published in GenBank, a BLAST search was carried out. Supplemental sequences of hymenolepidid cestodes were obtained from GenBank and added to the alignments. New and previously published sequences were aligned with the multiple alignment program ClustalW as implemented in Mega 4.0 [10] and indels were corrected manually in the *ITS1* fragment to minimize alignment gaps. Positions corresponding to regions of uncertain alignment were always excluded from the analysis.

Table 1 Prevalences (P) and range of intensities (I) (m = mean intensity) of the hymenolepidid species, *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis microstoma* and *Rodentolepis fraterna*, found in rodents from the Canary Islands (Spain)

	<i>H. diminuta</i>		<i>R. microstoma</i>		<i>R. fraterna</i>	
	P(%)	I(m)	P(%)	I(m)	P(%)	I(m)
Tenerife						
<i>Rattus</i> spp. (n = 106)	19.8	1-8 (2.4)	0.9	2	3.7	2-17 (9.5)
<i>R. r.</i> (n = 96)	19.8	1-5 (1.9)	1	2	1	17
<i>R. n.</i> (n = 10)	20	4-8 (6)	-	-	30	2-15 (7)
<i>M. m. d.</i> (n = 111)	-	-	2.7	2-4 (3)	14.4	1-500 (33.2)
La Palma						
<i>Rattus</i> spp. (n = 18)	33.3	1-7 (2.5)	-	-	5.5	1
<i>R. r.</i> (n = 16)	37.5	1-7 (2.5)	-	-	6.2	1
<i>R. n.</i> (n = 2)	-	-	-	-	-	-
<i>M. m. d.</i> (n = 80)	-	-	2.5	1-6 (3.5)	3.7	1
La Gomera						
<i>Rattus</i> spp. (n = 126)	40.5	1-15 (4)	-	-	-	-
<i>R. r.</i> (n = 126)	40.5	1-15 (4)	-	-	-	-
<i>R. n.</i> (n = 0)	-	-	-	-	-	-
<i>M. m. d.</i> (n = 27)	-	-	22.2	1-18 (6.3)	-	-
El Hierro						
<i>Rattus</i> spp. (n = 53)	18.9	1-20 (3.9)	-	-	1.9	1
<i>R. r.</i> (n = 53)	18.9	1-20 (3.9)	-	-	1.9	1
<i>R. n.</i> (n = 0)	-	-	-	-	-	-
<i>M. m. d.</i> (n = 173)	-	-	27.7	1-15 (4.7)	-	-
Gran Canaria						
<i>Rattus</i> spp. (n = 20)	10	1-10 (5.5)	-	-	-	-
<i>R. r.</i> (n = 19)	10.5	1-10 (5.5)	-	-	-	-
<i>R. n.</i> (n = 1)	-	-	-	-	-	-
<i>M. m. d.</i> (n = 41)	2.4	2	-	-	7.3	1-5 (3)
Lanzarote						
<i>Rattus</i> spp. (n = 20)	5	1	-	-	-	-
<i>R. r.</i> (n = 20)	5	1	-	-	-	-
<i>R. n.</i> (n = 0)	-	-	-	-	-	-
<i>M. m. d.</i> (n = 137)	-	-	5.8	1-32 (14.1)	2.9	1-3 (2)
Fuerteventura						
<i>Rattus</i> spp. (n = 19)	5.3	15	-	-	-	-
<i>R. r.</i> (n = 19)	5.3	15	-	-	-	-
<i>R. n.</i> (n = 0)	-	-	-	-	-	-
<i>M. m. d.</i> (n = 44)	-	-	2.3	2	-	-
La Graciosa						
<i>M. m. d.</i> (n = 42)	-	-	7.1	8-21 (14.3)	-	-
TOTAL						
<i>Rattus</i> spp. (n = 362)	25.4	1-20 (3.4)	0.3	2	1.7	2-17 (6.7)
<i>R. r.</i> (n=349)	25.8	1-20 (3.4)	0.3	2	0.9	1-17 (6.3)
<i>R. n.</i> (n = 13)	0.1	2	-	-	23.1	2-15 (7)
<i>M. m. d.</i> (n = 655)	15.4	4-8 (6)	10.8	1-32 (6)	4	1-500 (21.7)

R. r. = *Rattus rattus*, *R. n.* = *Rattus norvegicus*, *M. m. d.* = *Mus musculus domesticus*.

Variable positions of the alignment for the *COI* of *H. diminuta* were used to construct a network with the Network 4.6 program [11] using the median joining distance. Because it was not possible to get the same length for all the sequences of *H. diminuta*, the alignment was divided into three parts (344 bp, 403 bp and 389 bp) and three networks were inferred.

Animal trapping and use was approved by the Governmental competent entity "Excmos. Cabildos Insulares" of all the islands.

Results

Three species of hymenolepidid cestodes were identified, i.e. *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819), *Rodentolepis microstoma* (Dujardin, 1845) Spasskii, 1954 and *Rodentolepis fraterna* (Stiles, 1906), appearing in 9%, 7% and 3.1%, respectively, of all the studied rodents. All three species were found both in rats and mice (Table 1).

Spatial distribution

Hymenolepis diminuta and *R. microstoma* showed a widespread distribution in the Archipelago. *Hymenolepis diminuta* was found on all the seven islands and had a high prevalence in rats, appearing in a quarter of them (Table 1). The rats from La Gomera and La Palma showed the highest prevalences (Table 1) and statistically significant differences compared to the other islands. Moreover, the prevalence on La Gomera was higher than on El Hierro ($\chi^2 = 5.12$; $P < 0.05$), Tenerife ($\chi^2 = 4.26$; $P < 0.05$), Gran Canaria ($\chi^2 = 5.59$; $P < 0.05$), Lanzarote ($\chi^2 = 6.10$; $P < 0.05$), and Fuerteventura ($\chi^2 = 5.72$; $P < 0.05$). In the case of La Palma statistical differences in the prevalences were found with Lanzarote ($\chi^2 = 4.13$, $P < 0.05$) and Fuerteventura ($\chi^2 = 3.84$; $P < 0.05$).

Rodentolepis microstoma was detected on all the islands, except Gran Canaria. The highest prevalences for this species were detected in mice from El Hierro and La Gomera (Table 1) appearing with percentages significantly higher than in the other islands. Mice from El Hierro were more frequently parasitized than mice from La Palma ($\chi^2 = 17.64$; $P < 0.001$), Tenerife ($\chi^2 = 23.62$; $P < 0.001$), Lanzarote ($\chi^2 = 20.30$; $P < 0.001$), La Graciosa ($\chi^2 = 6.05$; $P < 0.05$) and Fuerteventura ($\chi^2 = 10.08$; $P < 0.005$). Also the prevalences detected on La Gomera were higher than those on La Palma ($\chi^2 = 10.51$; $P < 0.005$), Tenerife ($\chi^2 = 12.69$; $P < 0.001$), Lanzarote ($\chi^2 = 7.11$; $P < 0.01$), and Fuerteventura ($\chi^2 = 6.75$; $P < 0.01$).

Finally, *R. fraterna* was the rarest and least spread species, appearing only on five of the islands and with prevalences lower than 10% except for mice on Tenerife (Table 1) where these hosts were more parasitized by *R.*

fraterna than mice from La Palma ($\chi^2 = 5.32$; $P < 0.05$) and Lanzarote ($\chi^2 = 10.04$; $P < 0.005$).

In some cases, the spatial distribution of the species within islands was not uniform. On Tenerife, *R. microstoma* was detected only in the northeast of the island. In the case of El Hierro, *R. fraterna* was focused to one location called Guinea. The hymenolepidids found on Fuerteventura were located in the central part of the island, while on Lanzarote they were found only in the north. Finally, the only hymenolepidid species detected on La Graciosa islet, *R. microstoma*, was found only in a single peridomestic area (Figure 2).

Molecular analyses

For the *ITS1* sequences the fragments analyzed varied in size within species being necessary the inclusion of gaps in order to align the sequences. The longest were 704, 591 and 573 bp for *H. diminuta*, *R. microstoma* and *R. fraterna*, respectively. In the case of *COI* gene, no indels were observed, within or among the different species to align the sequences, and although partitioned in three fragments, a segment of 1136 bp could be analyzed. All the sequences obtained have been deposited in the GenBank with accession numbers JN258038-JN258041 for the *ITS1*, and JN258042- JN258053 for the *COI* gene.

Hymenolepis diminuta

The alignment of 704 bp, for the *ITS1* sequences of *H. diminuta* from all the seven islands together with a sequence from the GenBank [AF461125] showed only two variable positions. In this alignment two microsatellites were observed, $(TGT)_n$ and $(GA)_n$. For *COI*, six, seven and 11 variable positions out of 344, 403 and 389 bp, respectively were found for the first, second and third fragment, defining five different haplotypes for each region (Table 2). The three networks constructed showed the haplotypes from Lanzarote and Fuerteventura as the most distant with respect to the other islands, but clearly related among them (Figure 3). The fragments 1 and 3 indicated that Lanzarote and Fuerteventura haplotypes seem to have shared an ancestral haplotype turn very distant from the most frequent one that was found in the rest of the islands. Three, three and six mutations at first, second and third fragments, respectively, separated the eastern islands from the central/western islands (Table 2, Figure 3).

Rodentolepis microstoma

For the *ITS1*, only sequences for samples from Tenerife, La Gomera and El Hierro islands could be obtained. No variable positions were observed among sequences and the unique haplotype was identical to the sequences from GenBank: AY221159 and AY221166. For the *COI* gene, samples from three islands could be analyzed (Tenerife, La Gomera, and El Hierro). Only one variable position was observed among them, but three positions

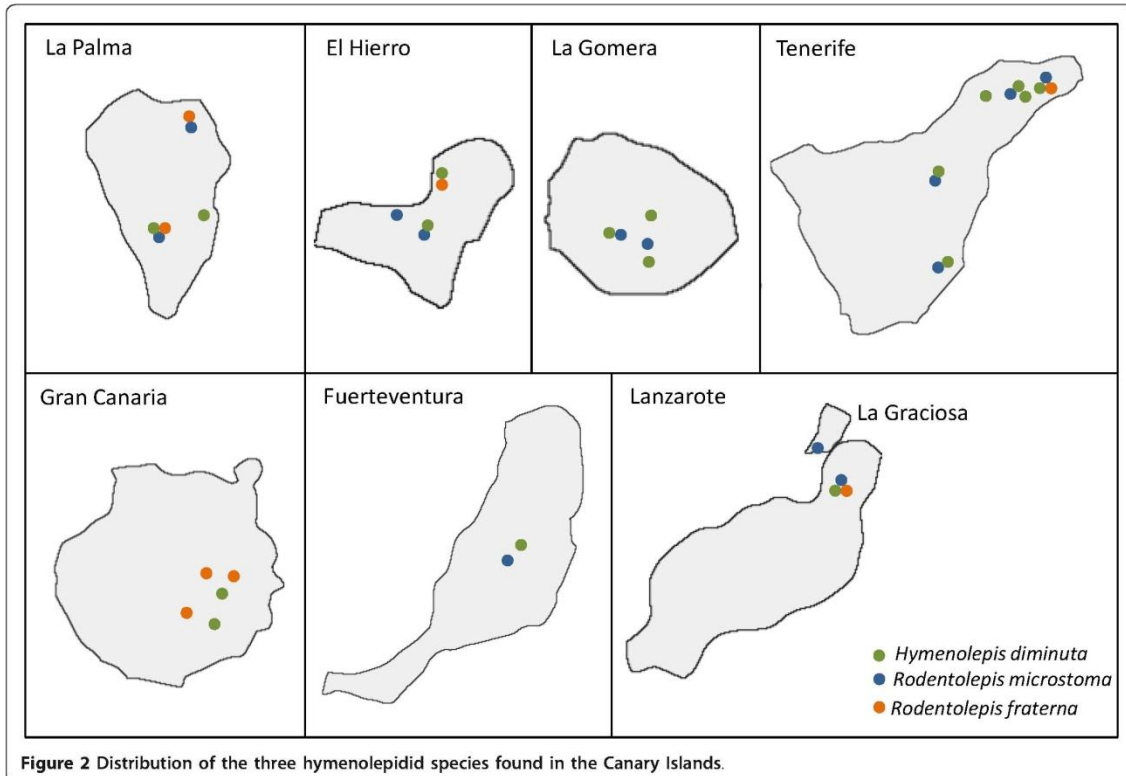


Figure 2 Distribution of the three hymenolepidid species found in the Canary Islands.

showed variation with respect to the sequence for this species from USA [12] [GenBank: AB494473].

Rodentolepis fraterna

The alignment for the *ITS1* sequences obtained from samples from Tenerife, La Palma, and El Hierro did not show any variation among them. When these sequences were compared with that deposited in the GenBank [AB494473] only two positions were different. The unique *COI* sequence obtained for one specimen of *R. fraterna* (Tenerife) was identical to a sequence from rats sampled from Egypt [GenBank: GU433103] and differed only in three positions out of 391 bp compared with a sequence obtained from a human sample also from Egypt [GenBank: GU433104].

Discussion

Rodentolepis microstoma and *R. fraterna* have been included within *Rodentolepis* by some authors, but there is still no consensus about their generic position [4,13].

R. nana (Siebold, 1852) and *R. fraterna* have sometimes been considered conspecific, but it is still not clear if they are two distinct species, one specialized to man (*R. nana*) and the other (*R. fraterna*) to rodents (see Macnish et al.

[8]). Moreover, it should be noted that *R. fraterna*, which occurs primarily in *Mus*, has also been found from *Apodemus sylvaticus* based on a molecular study [13]. Macnish et al. [8] showed that the representatives of the *nana/fraterna* complex from man and rodents are closely related and they form a strongly supported clade with respect to *R. microstoma*. Therefore, taking into account that there is no evidence of a clear genetic or morphological separation between *R. nana* and *R. fraterna*, and the available data in the literature about the life cycle and the health risk are referred to *R. nana*, here we consider them as conspecific.

Rodentolepis straminea and *R. microstoma* were earlier considered conspecific [14]. However, Casanova et al. [15] suggested independent status for them. The results of Haukisalmi et al. [13] fully supported the independent status of *R. straminea* and *R. microstoma* as host-specific parasites of *Apodemus* and *Mus*, respectively, and the present results based on the *ITS1* sequences also confirm that they are independent species (data not shown) [GenBank: JN258054 for *R. straminea*].

Although *H. diminuta* is more common in rats, in this study one house mouse was parasitized, and the

Table 2 Haplotypes found for each fragment of COI gene analyzed for *Hymenolepis diminuta* in Canary Islands.

Haplotypes	Variable positions										Islands									
Fragment 1 (344 bp)		1	1	1	2	2														
		7	0	1	2	8	9					H	P	G	T	C	F	L		
	6	3	8	4	6	2														
H1a	C	A	C	G	A	T					1		2		2					
H2a	T								2						
H3a	.	.	.	A	G	C												1		
H4a	.	.	G	A	G	.														1
H5a	.	G								1						
Fragment 2 (403 bp)		4	4	4	5	6	6	7												
		2	8	8	5	9	9	3				H	P	G	T	C	F	L		
	7	4	7	0	1	7	6													
H1b	A	T	T	C	A	A	T					1		3						
H2b	.	C						2		2					
H3b	G	.	G											1		
H4b	G	.	C	T	.	.	.													1
H5b	.	C	.	.	.	G	.				1									
Fragment 3 (389 bp)		7	7	7	8	8	9	0	0	0	0	0								
		6	7	8	8	9	9	0	2	5	8	8								
	6	8	4	6	2	4	6	0	7	1	7									
H1c	C	T	A	G	T	C	C	A	C	T	A		1		2	1				
H2c	.	C	G	T	.	.	T	.	T	.	G							1		
H3c	.	C	G	T	C	.	.	.	T	C	.									1
H4c	T			1						
H5c	T	.	G	.	.	.				1					

H (El Hierro); P (La Palma); G (La Gomera); T (Tenerife); C (Gran Canaria); F (Fuerteventura); L (Lanzarote); bp (base pairs).

opposite occurred for *R. microstoma*, i.e. although being typical of mice it appeared once in a rat. These exceptional cases have been observed on other islands [16,17].

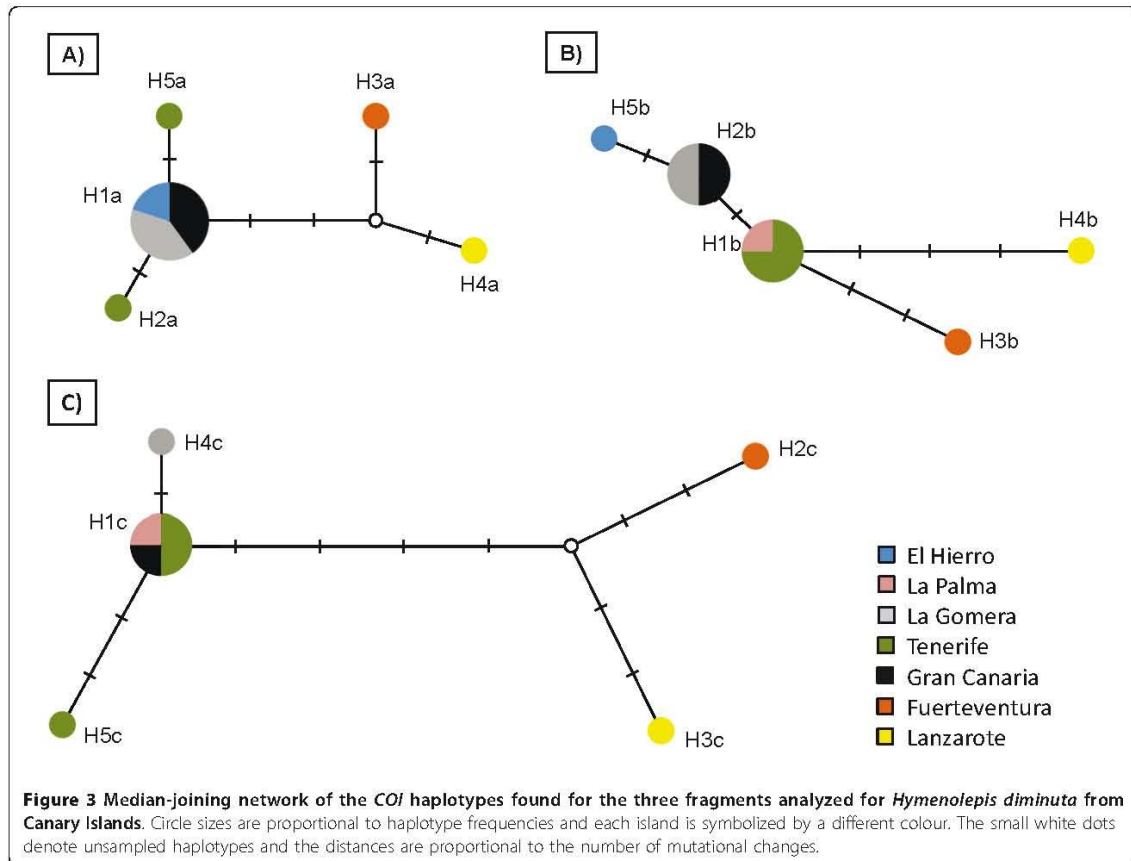
One of the main results of the present study is the widespread occurrence of hymenolepidid cestodes, particularly *H. diminuta* (in rats) and *H. microstoma* (in mice), in rodents on the Canary Island, despite the varying environmental conditions. Both are also cosmopolitan parasites of their particular hosts, and evidently show a high ability to colonize very different types of environments.

Different hypotheses have been developed to explain the lack of parasite species in introduced hosts, as occurs in the case of *R. fraterna* in La Gomera, Fuerteventura and La Graciosa, and *R. microstoma* in Gran Canaria. Firstly, the founder effect could have played an important role, considering that maybe not all the hymenolepidid species were present in the rodents that invaded the islands. Particularly, the sporadic occurrence of *R. fraterna* may be partly due to its overall rarity, compared with *H. diminuta* and *R. microstoma*, which has increased the probability that the colonizing hosts do not carry this parasite. Secondly, biotic and abiotic factors may be decisive for the establishment of parasite

species. These hypotheses have been considered to explain the lack of helminth richness in two other introduced mammal species on the Canary Islands, i.e. the rabbit *Oryctolagus cuniculus* (L., 1758) [18] and the Barbary ground squirrel *Atlantoxerus getulus* (L., 1758) [19].

Rodentolepis microstoma was found on Tenerife only in a laurel forest habitat and on El Hierro *R. fraterna* was focused to a single semiarid region. On Fuerteventura, an arid island, *R. microstoma* was found in a farming area only and *H. diminuta* in a place with a very small creek. In the case of Lanzarote, the hymenolepidids were found also only in a farming area, separated from the rest of the island by mountains that could have acted as a geographical barrier. Finally, on La Graciosa although farming, peridomestic and dump areas were sampled, *R. microstoma* was found only close to animal stables.

Complex life cycles requiring multiple host species, is the rule for cestodes. Unique to *R. microstoma* and *R. fraterna* is the capability of reproducing and completing their life cycles without the need of an intermediate host [2]. However, an intermediate host is necessary to complete the life cycle of *H. diminuta*. Several species



that act as intermediate host for these three hymenolepidids are present in the Canary Islands, which would facilitate the colonization of these parasites. Appropriate intermediate beetle host species for *R. microstoma* are *Tenebrio molitor* (L., 1758), *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797), *Tribolium confusum* (Duval, 1868) (Tenebrionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (L., 1758) (Silvanidae) [20], all being introduced species on the Archipelago [21]. Both *T. castaneum* and *O. surinamensis* are distributed widely and they are considered as invasive species [21].

On the other hand, multiple species have been cited as intermediate hosts of *H. diminuta*, including *T. castaneum* [22], distributed in all of the islands and *T. molitor* [23], present only on La Palma [21]. Burt [24] presented a list of 66 species of intermediate hosts (29 coleopterans, 2 dermapterans, 2 embiopterans, 11 lepidopterans, 9 orthopterans, 11 siphonapterans and 2 diplopods) for *H. diminuta*. This high range could have been one of the main factors in the successful introduction of the parasite to new habitats and regions.

Finally, the most common intermediate hosts capable of transmitting the larval stages of *R. nana* are arthropods, such as the beetle *T. confusum*, which is present on Tenerife, Gran Canaria and Lanzarote, and *T. molitor*, present on La Palma [21,25]. Fleas (Pulicidae), such as *Xenopsylla cheopis* (Rothschild, 1903), which has been introduced to the Canary Islands, is present on El Hierro, Tenerife, Gran Canaria and Fuerteventura (the congeneric species *Xenopsylla guancharum* Beaucourru Alcover Launay, 1989, endemic to Lanzarote, may also act as an intermediate host); *Pulex irritans* L., 1758 and *Ctenocephalides* spp., found on Tenerife and Gran Canaria, have also been implicated in the transmission of this parasite [21,25]. The confirmed presence of appropriate intermediate hosts for these hymenolepidid species could explain the establishment of these parasites in the Archipelago.

Hymenolepis diminuta, *R. microstoma* and *R. fraterna*, which are primarily parasites of rodents and secondarily also humans [3,4], have been reported practically throughout the world in places where murid rodents

exist. Rodents, particularly rats, are the definitive hosts and natural reservoirs of *H. diminuta* [3], but according to the host-parasite database of the Natural History Museum, London [26], *H. diminuta* has been reported worldwide from ca. 80 species of rodents, and also from insectivores and humans [13]. This suggests that *H. diminuta* includes multiple cryptic species [see 13].

Humans, usually children, can accidentally be infected by ingesting arthropods that are parasitized by larval stages of hymenolepidid cestodes. In developed countries, *H. diminuta* human infection is extremely rare and is limited to rural or degraded areas. Only few hundred human cases of *H. diminuta* have been reported worldwide (see Marangi et al. [3] and Tena et al. [27]). Evidence of a source of infestation from rats has been found in some of these cases.

Rodentolepis nana is the most commonly reported cestode of humans, infecting 175 million people worldwide [28], particularly in the tropics and subtropics [12]. It is more commonly reported as a cause of human infection since its transmission does not require any intermediate host and therefore can be spread directly from person to person or as an autoinfection. It has been shown that infection with *R. nana* can ultimately cause the death of an immunocompromized patient [2].

The presence of the zoonotic species *H. diminuta*, *R. microstoma* and *R. fraterna* among rodents from the Canary Islands suggests a potential health risk to humans in high risk areas. However, the facts that only *H. diminuta* in *Rattus* spp. shows a relatively high prevalence (Table 1) and that the distribution of some of these species islands is focused in certain islands or habitats, decrease the transmission risk to humans.

Molecular analyses

The *ITS1* sequences from *H. diminuta* showed differences in the number of repetitions of both microsatellites. However, considering the high number of copies of the *ITS* in the genome and the fact that all the copies do not have the same repetitions, these differences have not been considered.

The *COI* haplotypes from Lanzarote and Fuerteventura of *H. diminuta* were the most distant with respect to the other islands, and the possible presence of a common ancestor for both haplotypes, very distant from the most frequent and probably the central haplotype found in the rest of the islands, seem to indicate a separation in time. One or several colonization events could have occurred. If the colonization of the Canary Islands by *H. diminuta* was a unique event, a deep separation of the lineages and a reduced gene flow between the central/western islands with respect to the eastern ones has taken place since the original colonization event. In any

case, it would be interesting to confirm if the same distribution pattern is observed in the host species. Therefore, a molecular analysis for the hosts would be highly interesting in order to confirm this hypothesis.

On the other hand, the reduced number of sequences obtained from *R. microstoma* and *R. fraterna*, the low variation and the impossibility to obtain sequences from all the islands, do not allow establishing differences among them. It is relevant the high similarities that the *ITS1* and *COI* sequences of these two helminths from Canaries show with respect to other parts of the world.

Conclusions

Three species of hymenolepidids were identified in *Rattus* spp. and *M. m. domesticus* from the Canary Islands, *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis microstoma* and *Rodentolepis fraterna*. *Hymenolepis diminuta* and *R. microstoma* showed a widespread distribution in the Archipelago, and *R. fraterna* was the least spread species, appearing only on five of the islands. However, the hymenolepidids found on Fuerteventura, Lanzarote and La Graciosa were restricted to a small area. The presence of known intermediate hosts for these cestodes on the islands could have helped in the successful settlement of these parasites.

The fact that haplotypes from Lanzarote and Fuerteventura of *H. diminuta* are genetically the most distant with respect to the other islands, and the possible presence of a common ancestor for both haplotypes, very distant from the most frequent and probably the central haplotype found in the rest of the islands, seem to indicate that two colonization events or a single event with subsequent isolation and reduced gene flow has led to a deep separation. It would be interesting to analyze the hosts in order to confirm the same phenomenon.

Acknowledgements

This work was supported by projects CGL 2006-04937 and CGL 2009-07759BOS. We thank to all the "Excmos. Cabildos Insulares" of the Canary Islands the permission for capture the animals. The research work of VH has been supported by NSF PBI award Nos. 0818696 and 0818823.

Author details

¹Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, 38203 Tenerife, Canary Islands, Spain. ²Vantaa Research Unit, Finnish Forest Research Institute, PO Box 18, FI-01301 Vantaa, Finland. ³Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Diagonal s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Authors' contributions

PF, ML and CF performed the field work. CF realized the morphological identification. PF, ML and MH performed the molecular experiments. Discussion of the results was developed by all co-authors. Manuscript was written, read and approved by all the authors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 3 August 2011 Accepted: 26 September 2011
Published: 26 September 2011

References

- Czaplinski B, Vaucher C: **Family Hymenolepididae Ariola, 1899.** In *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. Edited by: Khalil LF, Jones, Bray RA. Cambridge: Commonwealth Agricultural Bureaux International; 1994:595-663.
- Olson PD, Yoder K, Fajardo L-G LF, Marty AM, van de Pas S, Olivier C, Relman DA: **Lethal invasive cestodiasis in immunosuppressed patients.** *J Infect Dis* 2003, **187**:1962-1966.
- Marangi M, Zechini B, Fileti A, Quaranta G, Aceti A: **Hymenolepis diminuta infection in a child living in the urban area of Rome, Italy.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:3994-3995.
- Macnish MG, Ryan UM, Behnke JM, Thompson RCA: **Detection of the rodent tapeworm *Rodentolepis* (= *Hymenolepis*) *microstoma* in humans. A new zoonosis?** *Int J Parasitol* 2003, **33**:1079-1085.
- Foronda P, Abreu-Acosta N, Casanova JC, Ribas A, Valladares B: **A new Anoplocephalid (Cestoda: Cyclophyllidae) from *Gallotia atlantica* (Reptilia, Lacertidae) in the Canary Islands, Spain.** *J Parasitol* 2009, **95**:678-680.
- Foronda P, López-González M, Miquel J, Torres J, Segovia M, Abreu-Acosta N, Casanova JC, Valladares B, Mas-Coma S, Bargues MD, Feliu C: **Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain).** *Acta Trop* 2010, **114**:123-127.
- Callejón R, de Rojas M, Nieberding C, Foronda P, Feliu C, Guevara D, Cutillas C: **Molecular evolution of *Trichuris muris* isolated from different Muridae hosts in Europe.** *Parasitol Res* 2010, **107**:631-641.
- Macnish MG, Morgan-Ryan UM, Monis PT, Behnke JM, Thompson RCA: **A molecular phylogeny of nuclear and mitochondrial sequences of *Hymenolepis nana* (Cestoda) supports the existence of a cryptic species.** *Parasitology* 2002, **125**:567-575.
- Nakao M, Sako Y, Yokoyama N, Fukunaga M, Ito A: **Mitochondrial genetic code in cestodes.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **111**:415-240.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1596-1599.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A: **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** *Mol Biol Evol* 1999, **16**:37-48.
- Okamoto M, Agatsuma T, Kurosawa T, Ito A: **Phylogenetic relationships of three hymenolepid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences.** *Parasitology* 1997, **115**:661-666.
- Haukissalmi V, Hardman LM, Foronda P, Feliu C, Laakkonen J, Niemimaa J, Lehtonen JT, Henttonen H: **Systematic relationships of hymenolepidid cestodes of rodents and shrews inferred from sequences of 28S ribosomal RNA.** *Zool Scripta* 2010, **39**:631-641.
- Baer JG, Tenora F: **Some species of *Hymenolepis* (Cestoidea) from rodents and from primates.** *Acta Sc Nat Brno* 1970, **4**:1-32.
- Casanova JC, Santalla F, Durand P, Vaucher C, Feliu C, Renaud F: **Morphological and genetic differentiation of *Rodentolepis straminea* (Goeze, 1752) and *Rodentolepis microstoma* (Dujardin, 1845) (Hymenolepididae).** *Parasitol Res* 2001, **87**:439-444.
- Jimenez AM: **Contribucion al conocimiento de la Parasitofauna de micromamíferos de la Isla de Corcega (Francia).** Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia 1992, 421.
- Milazzo C, Gouy de Bellocq J, Cagnin M, Casanova JC, di Bella C, Feliu C, Morand S, Santalla F: **Hemintns and ectoparasites of *Rattus rattus* and *Mus domesticus* from Sicily.** *Comp Parasitol* 2003, **70**:199-204.
- Foronda P, Valladares B, Lorenzo-Morales J, Ribas A, Feliu C, Casanova JC: **Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Macaronesia.** *J Parasitol* 2003, **89**:952-957.
- López-Darias M, Ribas A, Feliu C: **Helminth parasites in native and invasive mammal populations: comparative study on the Barbary ground squirrel *Atlantoxerus getulus* L. (Rodentia, Scuriidae) in Morocco and the Canary Islands.** *Acta Parasitol* 2008, **53**:296-301.
- Cunningham L, Olson PD: **Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:123.
- Izquierdo I, Martín JL, Zurita N, Arechavaleta M: **Lista de especies silvestres de Canarias (Hongos, Plantas y Animales Terrestres).** *Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias, La Laguna* 2004.
- Arrojo-W L, Tantaletín-V M, Huanca-M J: **A new intermediate host of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) from Peru.** *Rev Peru Biol* 2004, **11**:107-108.
- Shea JF: **Sex differences in frass production and weight change in *Tenebrio molitor* (Coleoptera) infected with cysticercoids of the tapeworm *Hymenolepis diminuta* (Cestoda).** *J Insect Sci* 2005, **5**(31):1536-2442, (6pp, ISSN).
- Burt MBD: **Aspects of life history and systematics of *Hymenolepis diminuta*.** In *Biology of the tapeworm *Hymenolepis diminuta**. Edited by: Arai HP. Academic Press, New York; 1980:1-57.
- Lloyd S: **Other cestode infections: Hymenolepiosis, Diphyllbothriosis, Coenurosis and other adult and larval cestodes.** In *Zoonoses*. Edited by: Palmer SR, Soulsby L, Simpson DIH. Oxford University Press; 1998:651-663.
- Gibson DI, Bray RA, Harris EA: **Host-Parasite database of the Natural History Museum, London.** (Access 2005). [http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/host-parasites/].
- Tena D, Perez Simon M, Gimeno C, Perez Pomata MT, Illescas S, Amondarain I, Gonzalez A, Dominguez J, Bisquert J: **Human infection with *Hymenolepis diminuta*: Case report from Spain.** *J Clinical Microbiol* 1998, **36**:2375-2376.
- Crompton DWT: **How much human helminthiasis is there in the world?** *J Parasitol* 1999, **85**:397-403.

doi:10.1186/1756-3305-4-185

Cite this article as: Foronda et al.: Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain). *Parasites & Vectors* 2011 **4**:185.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

IV. Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach.

Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach

Carlos Feliu^{1,2*}, Mercedes López³, María S. Gómez¹, Jordi Torres^{1,2}, Santiago Sánchez¹, Jordi Miquel^{1,2}, Néstor Abreu-Acosta⁴, Juan M. Segovia¹, Aarón Martín-Alonso², Isabel Montoliu¹, Mercedes Villa¹, Ángela Fernández-Álvarez³, Abdoulaye J.S. Bakhom^{1,2}, Basilio Valladares³, Jorge Orós⁵ and Pilar Foronda³

¹Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Diagonal s/n, 08028 Barcelona, Spain; ²Institut de Recerca de la Biodiversitat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ³University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico F. Sánchez s/n, 38203, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain; ⁴Infulab S.L., Mencey Romen 7, 38530, Candelaria, Tenerife, Spain; ⁵Department of Histology and Pathology, Veterinary Faculty ULPGC, Trasmontaña, s/n, 35416, Arucas (Las Palmas), Canary Islands, Spain;

Abstract

The parasite fauna (protozoa, helminths and insects) of the two most widespread Murinae rodents in El Hierro (Canary Islands, Spain), the black rat (*Rattus rattus*) and the house mouse (*Mus musculus domesticus*) was studied. Faunistic, ecological, ecotoxicological data, as well as information on the biology of some nematode parasites of *R. rattus* are provided. The present work is unprecedented in the Canary Islands, and provides the first data on the parasite biodiversity in Murinae from the archipelago. Concerning to parasitofaunas stands out: a) impoverishment of biodiversity of helminths respect of which have the same hosts in other islands; b) increasing the number of species of Siphonaptera, even compared with flea species that parasitize the same hosts from continental biotopes.

Keywords

Canary Islands, El Hierro, parasites, heavy metals, *Mus musculus domesticus*, *Rattus rattus*

Introduction

The role of the black rat (*Rattus rattus*) and the house mouse (*Mus musculus domesticus*) for public health has been approached in multiple occasions since they are cosmopolitan species that colonize diverse habitats and trend to be peridomestic (Cameron 1949, Gratz 1994, Meyer *et al.* 1995, Battersby and Webster 2001, Singleton *et al.* 2003, etc). In isolated ecosystems most of these studies have been targeting at the parasite helminth fauna and the potential role of rodents as reservoirs of parasitic zoonoses (Casanova *et al.* 1996, Miquel *et al.* 1996, Waugh *et al.* 2006, Milazzo *et al.* 2010).

The present work was carried out in El Hierro (Fig. 1), the most western island of the Canary Archipelago (Spain). Several studies on parasites (protozoan, helminths and arthropods) of *R. rattus* and *M. m. domesticus*, the two most widespread rodents on the island, have permitted to provide the first data about the parasite fauna of both murine species in the Canary

Islands. Previously, similar multidisciplinary studies had been performed only sporadically. In addition to analyzing the parasite biodiversity, their importance relies on the necessity of information on the degree of infections in nature as well as on their sanitary and epidemiological relevance (Webster and Macdonald 1995). This work also includes data on the biology of some helminth species (Nematoda), and about the presence of heavy metals (Cd, Pb, Hg) in hosts. Heavy metals, similarly to other pollutants, are worldwide distributed into the environment and can cause toxic effects in the biota. Information about these effects in wild mammals is limited despite that it may be relevant to predict environmental risk (Hamers *et al.* 2006, Sanchez-Chardi *et al.* 2007). Therefore, biomonitoring pollution through wild animals is useful for the assessment of environmental quality. Nevertheless, few works have been carried out in areas of high ecological interest, which are also subject to other types of anthropogenic chemical stress (Eira *et al.* 2005). Such is the case of El Hierro designated as biosphere reserve by UNESCO in year 2000.

*Corresponding author: cfeliu@ub.edu

Materials and methods

Samples collection

El Hierro, with an area of 268 km², is located 17°53'–18°09'W and 27°38'–27°50'N and belongs to the Canary Archipelago (Northwest of Africa) (Fig. 1). From this island, a total of 226 rodents (53 *R. rattus* and 173 *M. m. domesticus*) were captured in 2007–2010 and euthanized. The samples were obtained during all the seasons at different altitudes, between 76–1337 m, mainly in the northern part of the island.

Parasites examination

Faeces were obtained from 37 animals (11 rats and 26 mice), homogenized in vials containing 2% (w/v) of aqueous potassium dichromate (K₂Cr₂O₇), and stored at 4°C. In the laboratory, faecal samples were examined for the presence of parasites using different techniques. A flotation method using modified Sheather's sugar solution (sp.g.1.3) was carried out in order to look for *Eimeria* (Sheather 1923).

Thirty faecal samples (14 rats and 16 mice) were concentrated using a modification of the Ritchie's formaldehyde-ether method in sterile conditions (Ritchie 1948). Part of the sediment was fixed with 10% formaldehyde and analysed individually for the presence of *Giardia* cysts using direct observation with iodine solution (Golvan and Drouhet 1977). Thin smears were made from concentrated faecal samples of nine rats and 26 mice, and screened for *Cryptosporidium* oocysts by using the modified Ziehl-Nielsen stain (Henriksen and Pohlenz 1981). Protozoan

cysts were studied using a Provis AX 70 (Olympus, New York, USA) microscope.

Helminth and arthropods parasites were collected and processed for morphological analysis. All material was preserved in 70% ethanol. Cestodes and acanthocephalans were stained in ferrum-acetocarmine and mounted in Canada balsam. Nematodes were cleared in Amann lactophenol. Fleas were treated with potash prior to be mounted in Canada balsam.

Intermediate hosts

In order to look for the intermediate hosts of the detected helminths, five invertebrate species, 97 *Pimelia laevigata costipennis*, 150 *Hegeter amaroides*, 28 *Alloxantha ochracea* (Coleoptera), 2 *Cydnus aterrimus* (Hemiptera) and 4 *Canari-labis maxima* (Dermaptera) from the location called Guinea (27°46'29"N; 17°59'55"W) were dissected and analyzed.

Heavy metals

Twenty rats from Guinea and 20 mice from Frontera forest site (27°45'00"N; 17°59'09"W), were used to analyze levels of metals (Cd, Hg and Pb) in their tissues. Samples of kidneys, liver and muscle were taken using stainless-steel instruments and frozen at –20°C until being processed. Around 100 mg of each sample was mineralized in Teflon vessels with 2 ml HNO₃ (Merck, Suprapur, Darmstadt, Germany) and 1 ml H₂O₂ (Panreac, Barcelona, Spain) overnight in an oven at 90°C. All process was standardized in the Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (detection limits and accuracy of results). All concentrations were determined as ng g⁻¹ wet weight.

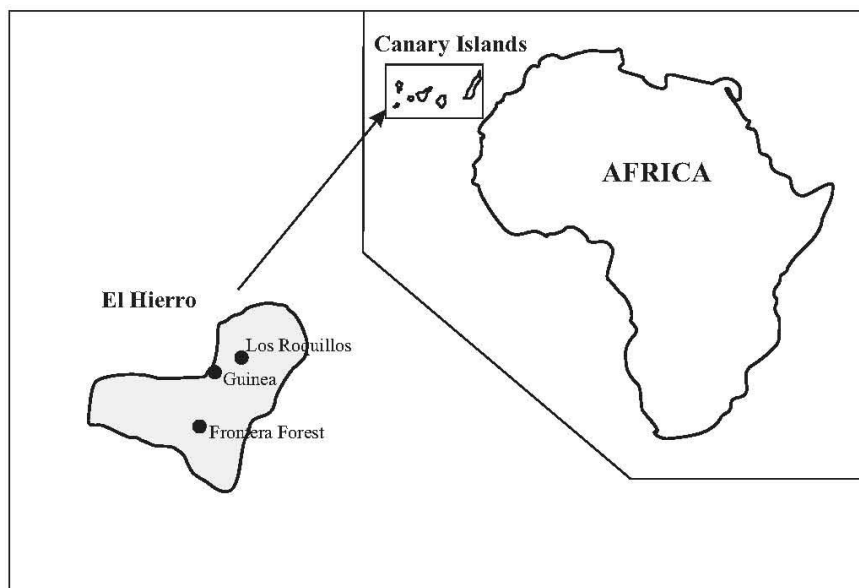


Fig. 1. Location of El Hierro (Canary Islands, Spain) and the studied places

Data analysis

The ecological terminology follows Bush *et al.* (1997). Several statistical tests, such as χ^2 , Kruskal-Wallis and Mann-Whitney, were used to evaluate significance in the comparisons of prevalences and abundances. Non parametric Spearman's correlation was used to test relationship between abundance of helminths and altitude.

Generalised linear models with SPSS Statistics 17.0 were used to evaluate factors affecting abundance of helminth species. Negative binomial error terms were specified for this purpose. Abundance of the most prevalent species was screened as dependent variable. The abundance of the remaining helminth species, total abundance and richness of the communities, host-sex, season and kind of biotope where the hosts were trapped were regarded as independent variables. The influence of parasitism on the weight of the rats was assessed by a log-normal regression. In that case, abundance of all helminths and flea species, as well as biotope, were included as predictors. Several pairwise two-way interactions between the above specified variables were also considered in the preliminary models. The minimal acceptable model was derived by backward stepwise deletion from a preliminary model that included all variables and interactions considered. The cut-off for keeping a variable in the final model was set to $p < 0.05$.

Results

Three protozoan, 18 helminths, five siphonapteran and one anopluran species were identified (Table I).

Both rodent species were found infested by *Giardia muris*, *Eimeria* sp. and *Cryptosporidium parvum*, with general prevalences 16.6%, 67.6% and 48.6%, respectively. There were no significant differences between hosts, neither between biotopes (Table I).

The helminth fauna of *M. m. domesticus* is composed of two cestode and six nematode species, plus acanthocephalan larvae of one species. The oioxenous species *Rodentolepis microstoma* and *Syphacia obvelata* had the highest prevalences and mean intensities (Table I). Among the oligoxenous/eurixenous, *Trichuris muris* and *Mastophorus muris* were the most frequently detected species, while *Protospirura* sp., *Rictularia* sp., *Heterakis spumosa* and *Prosthorrhynchus cylindraceus larvae* were occasional. The most remarkable absence belonged to digenean.

The general infection by helminths in *M. m. domesticus* was not high (60.7%) and it was altitudinally concentrated, especially for *R. microstoma* and *T. muris*. In fact, mice parasitized by both helminth species have mainly been found in the zone of the highest altitude, which corresponds to Frontera forest place (KW = 18.34, $p < 0.01$).

Considering the mice with helminths, most of them appeared infested by few species (46.2% with one, 11.6% and 2.9% with two and three, respectively).

The helminth fauna of *R. rattus* was constituted of four cestode, 10 nematode, and one acanthocephalan species. The composition of this helminth fauna, from qualitative and quantitative points of view, was surprising, due to the atypical presence of four nematode species isolated from stomach (*M. muris*, *Protospirura* sp., *Streptopharagus greenbergi* and *Gongylonema neoplasticum*) and *Moniliformis moniliformis* in the intestine, with a notable prevalence and intensity of parasitism (Table I). These species, except *M. muris*, were mainly found in semiarid and close to sea level biotopes. This fact was relevant in Guinea, where appeared the last five cited species. *Streptopharagus greenbergi* and *M. muris* were the most prevalent species (35.8% and 34%, respectively) and *M. moniliformis* had the highest mean intensity (55.9). *Rodentolepis fraternus*, *Mesocestoides* sp. larvae, *Calodium hepaticum*, *Rictularia* sp., and *H. spumosa* were lacking of importance in rats studied. Again, the absence of digenean occurred.

Polyparasitism was significantly higher in *R. rattus* compared to *M. m. domesticus* ($U = 2433.0$, $p < 0.01$). The 79.1% of the studied rats presented helminth species, where 20.7% had one species, 22.6% and 15.1% showed two and three, respectively; and 11.3% hosted four to six.

Related to ectoparasites, the louse *Polyplax spinulosa* was present in 4.4% of rats. All five siphonapteran species detected in this study parasitized *M. m. domesticus* but only three of them were detected on rats (Table I). *Rattus rattus* and *M. m. domesticus* showed similar overall flea prevalence (42.2% and 43.1%, respectively; $\chi^2 = 1.40$, $p = 0.24$). However, significant differences were found in prevalence of *Xenopsylla cheopis* ($\chi^2 = 5.85$, $p < 0.05$) and *Leptopsylla segnis* ($\chi^2 = 10.12$, $p < 0.01$) with respect to host species. In contrast, parasitic burdens were not significantly different for the three common flea species detected in both rodent species.

In mice, the most prevalent flea species was *S. t. tripectinata* (28.8%). The prevalence of *N. barbarus* and *L. segnis* ranged from 9.4–7.5%. Concerning *Echidnophaga murina* and *Xenopsylla cheopis*, both fleas showed the lowest prevalence (5.0–3.8%). In the same host, a negative correlation was found between abundance of *E. murina* and host weight ($B = -0.166$; Wald = 5.68; $p < 0.05$). Every siphonapteran species, except *S. t. tripectinata*, displayed similar mean intensity. Most of *M. m. domesticus* parasitized by fleas harboured only one flea species (52 individuals), some of them (16 individuals) carried out two flea species and only one mouse was parasitized by three species (*L. segnis*, *S. t. tripectinata* and *N. barbarus*). The most prevalent flea association was *S. t. tripectinata*-*N. barbarus* (6 of 16 individuals, 37.5%).

In rats, *L. segnis* and *X. cheopis* were the most prevalent siphonapteran species (24.4% and 13.3%, respectively). The other flea species (*N. barbarus*) showed 8.9% of prevalence (Table I). Ten rats were parasitized by one flea species, four by two and one carried three species (*L. segnis*, *X. cheopis* and *N. barbarus*). In this murinae species, the most prevalent two-flea association was *L. segnis*-*N. barbarus* (3 of 4 individu-

Table 1. Infection site, prevalence (P), mean intensity (MI) and the variance (Var)/mean ratio (MR) of protozoans, helminths and ectoparasites of *Mus musculus domesticus* (n = 173) and *Rattus rattus* (n = 53) from El Hierro, Canary Islands

Parasite group	Parasite species	Infection site			Host taxon		
		P (%)	MI (CI 95%)	Var/MR	P (%)	MI (CI 95%)	Var/MR
Protozoa	<i>Giardia muris</i>	12.5 (n = 16)			21.4 (n = 14)		
	<i>Eimeria</i> sp.	69.2 (n = 26)			63.6 (n = 11)		
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	38.5 (n = 26)			77.8 (n = 9)		
Cestoda	<i>Rodentolepis microstoma</i>	27.2	4.6 (3.5–5.8)	7.2			
	<i>Taenia taeniiformis</i> larvae	5.8	1.1 (1.0–1.3)	1.1	20.8	1.3 (1.0–1.7)	1.3
	<i>Hymenolepis diminuta</i>				18.9	3.9 (1.9–9.0)	11.0
	<i>Rodentolepis fraternae</i>				1.9	*	*
	<i>Mesocostoides</i> sp. larvae				3.8	*	*
					1.9	*	*
Nematoda	<i>Calodium hepaticum</i>				7.5	2.5 (1.0–4.7)	4.1
	<i>Trichosomoides crassicauda</i>				17.0	7.4 (4.6–12.2)	10.6
	<i>Gongylonema neoplasticum</i>				34.0	8.3 (4.9–15.3)	18.6
	<i>Mastophorus muris</i>	12.7	2.2 (1.6–3.1)	3.4	20.8	16.8 (7.6–29.8)	35.5
	<i>Protospirura</i> sp.	1.2	*	*	35.8	16.1 (10.0–29.9)	42.8
	<i>Sireptopharagus greenbergi</i>	0.6	*	*	1.9	*	*
	<i>Rictularia</i> sp.	0.6	*	*	1.9	*	*
	<i>Heterakis spumosa</i>				9.4	16.8 (7.6–25.2)	22.4
	<i>Syphacia muris</i>	15.0	22.9 (14.0–37.5)	59.4			
	<i>Syphacia obvelata</i>	13.9	2.1 (1.5–3.0)	3.3	5.7	*	*
	<i>Trichuris muris</i>				26.4	55.9 (30.7–119.4)	167.4
	Acanthocephala	<i>Moniliformis moniliformis</i>	1.2	*	*		
	<i>Prosthorhynchus cylindraceus</i> larvae						
Siphonaptera	<i>Echidnophaga murina</i>	5.0	1.2 (1.0–1.5)	1.3			
	<i>Leptopsylla segnis</i>	7.5	1.2 (1.0–1.4)	1.3	24.4	1.7 (1.2–2.6)	2.2
	<i>Nosopsyllus barbarus</i>	9.4	1.1 (1.0–1.3)	1.1	8.9	3.0 (2.0–4.2)	3.1
	<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	28.8	3.7 (2.8–5.0)	6.7			
	<i>Xenopsylla cheopis</i>	3.8	1.3 (1.0–1.5)	1.5	13.3	3.5 (1.7–8.0)	6.7
Anoplura	<i>Polyplax spinulosa</i>				4.4	*	*

CI – confidence interval; *occasional presence.

Table II. Prevalence (%) of larval helminths in invertebrate intermediate hosts

Intermediate host species	Parasite genera		
	<i>Streptopharagus</i>	<i>Gongylonema</i>	<i>Mastophorus</i>
<i>Pimelia laevigata costipennis</i>	16.5	4.1	2.0
<i>Hegeter amaroides</i>	7.3	2.6	
<i>Alloxantha ochracea</i>			
<i>Cydnus aterrinus</i>			
<i>Canarilabis maxima</i>			

als, 75%). The overall prevalence of ectoparasites was similar in both host species (42.8%).

After eliminating in a backward stepwise manner non significant explanatory variables or interactions from the preliminary saturated model, weight of the rats was found to be negatively correlated with abundance of *M. muris* ($B = -0.018$, Wald = 7.21, $p < 0.01$); *S. greenbergi* ($B = -0.025$, Wald = 12.47, $p < 0.01$); *M. moniliformis* ($B = -0.006$, Wald = 9.53, $p < 0.01$) and the flea *L. segnis* ($B = -0.294$, Wald = 7.75, $p < 0.01$). On the other hand, significant positive correlations were found between abundance of *Protospirura* sp. ($B = 0.021$, Wald = 12.14, $p < 0.01$); *G. neoplasticum* ($B = 0.050$, Wald = 4.66, $p < 0.05$); *T. muris* ($B = 0.994$, Wald = 23.60, $p < 0.01$) as well as coinfection *M. muris*-*L. segnis* ($B = 0.026$, Wald = 5.32, $p < 0.05$) and weight of rats.

Concerning to the identification of the larval stages found in the intermediate hosts, it was based on the articles with detailed larval morphology (Desportes *et al.* 1949; Chabaud 1954 a, b; Quentin 1970; Quentin and Seureau 1978; Quentin *et al.* 1986) (Table II).

The mean concentration of Cd in kidneys, liver and muscle of *R. rattus* were 96.3, 19.1 and 1.3 ng g⁻¹, respectively, whereas in *M. m. domesticus* were 36.8, 12.6 and 1.4 ng g⁻¹, respectively. Concerning Pb, the respective obtained values were 111.6, 24.6 and 14.6 ng g⁻¹ in rats and 10.3, 14.9, and 10.1 in mice. It was possible to quantify the level on Hg in kidneys of rats only (70.4 ng g⁻¹) while the hepatic and the muscular levels were under the limit of detection. Renal, hepatic and muscular levels of Hg from mice were 44.5, 25.6 and 11.1 ng g⁻¹ respectively. The highest individual levels of Cd, Pb and Hg were found in the kidneys of individuals of *R. rattus* (752.6, 452.2 and 245.1 ng g⁻¹, respectively).

Discussion

The presence of protozoans in Murinae rodents has been revealed several times and with varying percentages (Franjola *et al.* 1995, Webster and Macdonald 1995, Chalmers *et al.* 1997, Torres *et al.* 2000, van Keulen *et al.* 2002, Sturdee *et al.* 2003, Lv *et al.* 2009). The general prevalences of *Giardia* and *Eimeria* detected in the present work were similar to that found in murids by other authors (Higgs and Nowell 2000, Bajer 2008). Relative to *Cryptosporidium*, the prevalence was higher than

found for murids by other authors, where values were around 10% (Torres *et al.* 2000, Foo *et al.* 2007).

From the helminthological point of view, the parasite fauna of *M. m. domesticus* and *R. rattus* were structurally similar to that found in the same hosts in other Atlantic/Mediterranean islands, although with less richness (Jimenez 1992; Casanova *et al.* 1996; Mas-Coma *et al.* 2000; Milazzo *et al.* 2003, 2010). The studied hosts did not show notable infections, with the exception of *R. microstoma* in *M. m. domesticus* trapped in Frontera forest (a laurel forest located at 1305 m asl), and *R. rattus* with stomach nematodes and *M. moniliformis* in Guinea and Los Roquillos (27°49'12"N; 17°57'49"W)(semi-arid isoclimatic zones located at 76 m and 392 m asl, respectively).

The fact that *R. microstoma* was the most prevalent species (27.2%) in *M. m. domesticus* from El Hierro could be due to the high number of mice studied ($n = 75$) from Frontera forest place, where this cestode was preferentially located, opposite to that occur in other Canary islands where *R. microstoma* is highly spread (Foronda *et al.* 2011). However, there is a clear seasonal influence in these results (KW = 25.9, $p < 0.01$). At the beginning of autumn, a high percentage of infested mice (57.7%) was observed, with a mean intensity of 4.4. The mean weight of infested mice was 12.5 g in this season ($n = 52$).

In the same area, no infection by *R. microstoma* was found in middle winter, and the mean weight was higher (14.5 g, $n = 16$). However, no relationship was found between *R. microstoma* and weight, neither considering only these two parameters, nor considering the coinfection with other helminth species, especially *T. muris*. It is important to take into account that the hepatic site of *R. microstoma* and its big size imply several physiological and digestive pathologies previously described (Simpson and Gleason 1975, Pappas and Schroeder 1977, Evans *et al.* 1985, Novak *et al.* 1985, Novak and Nombrado 1988, etc).

In rats from Guinea and Los Roquillos, *M. muris*, *S. greenbergi*, *Protospirura* sp., *G. neoplasticum* (stomach) and *M. moniliformis* (duodenum-small intestine) were detected at digestive level and showed notable prevalences. This poly-parasitism is uncommon in *R. rattus*, following previous studies about this host in insular and continental ecosystems (Jimenez 1992, Feliu *et al.* 1997). Only in the North of Africa the presence of several stomach nematodes seems usual

(Jimenez 1992). The characteristics of the helminth fauna in the isolated ecosystems (Magnanou and Morand 2006) and the physiography of the island, with biotopes similar to North Africa, could explain these results. In this case, the seasonal incidence was again evident (KW = 16.53, $p < 0.01$), appearing the highest prevalence of infested rats (91.3%) in autumn (with a mean of 2.14 species in stomach/duodenum). This was notably lower in winter (14.2%, with a mean of one species), and increased in summer (50%, mean 2.25). There were not enough animals captured in spring to be compared. A relationship between polyparasitism and weight of the rats is observed. In the periods when the infections was higher, the rats were juveniles and sub-adult (101.1 g mean weight in autumn; 78.2 g in summer) while in the period of low infections, rats were adult (140.1 g mean weight in winter) (<100 g, juveniles; >130 g, adults; following Delattre and Le Louar 1981).

The negative correlation between *M. muris* and rat weight could be related to the occupancy of the typical site (stomach) by the nematode, which could cause digestive disturbance, and consequently weight loss.

A histopathological study of the microhabitat (duodenum) of the helminth with the highest mean intensity (*M. moniliformis*) was carried out. Histological lesions were observed. These lesions included mild catarrhal enteritis and occasional dilatation of the intestinal crypts. Parasitic forms compatible with acanthocephalans were also observed associated with the luminal surface. Taking into account that the detected pathology is compatible with a weight loss (Stephenson *et al.* 2000) and the fact that bacterial co-infection are often present in severe infections by acanthocephalans (Taraschewski 2000), it is highly probable that the parasitic burden that harbour the rats affect the growth, or even cause the host death (Crompton and Nickol 1985). It is more probable in the common cases where *M. moniliformis* share host with other stomach species. At this point, it is important to remember the negative correlation between *S. greenbergi*, *M. muris* and *M. moniliformis* and rat weight. Furthermore, diverse physiopathological effects caused by *Mastophorus* and *Protospirura* have been described (Krauss 1977, Mafiana *et al.* 1997, Lowrie *et al.* 2004). On the other hand, the capacity of *G. neoplasticum* to cause carcinoma in rats have been questioned and related with avitaminoses (Petithory *et al.* 1997, Anderson 2000).

The fact that different helminths coexisted at the stomach of rats from Guinea was an indication that these worms could have the same intermediate host (Anderson 2000). This led us to found the nematode larvae of the majority of the stomach species (*Streptopharagus*, *Gongylonema* and *Mastophorus*) in the two darkling beetles species endemic to El Hierro *P. l. costipennis* and *H. amaroides*. Guinea represents an exclusive endemiotope of the island, which would explain the singularity of the stomach polyparasitism in *R. rattus* at this enclave, although there is no information on the intermediate host of *Protospirura* sp.

The only louse species found in the present work is specific of rats. Concerning siphonapterans, both host species

showed quite similar overall prevalence. *Mus m. domesticus* displayed more richness than *R. rattus* (Index of Margalef = 0.75; 0.51, respectively). Mice from El Hierro were richer in flea species than from Iberian Peninsula, opposite to that occurs for helminths (Gomez *et al.* 1988). In this study, as in Beaucourmu *et al.* (1989), neither *S. t. tripectinata* nor *E. murina* were detected on *R. rattus*, although both had been previously reported on this host (Beaucourmu and Launay 1990). Among the five species found in El Hierro, the most prevalent and abundant was *S. t. tripectinata*. *Xenopsylla cheopis* was detected in both hosts, but with greater frequency and abundance in rats, its usual host.

Nevertheless the most prevalent flea association in rats was *L. segnis-N. barbarus*. These two species have already been reported in mice and rats (Beaucourmu and Launay 1990) but results of our study showed that *L. segnis* seems to have a predilection for *R. rattus*. On the other hand, *N. barbarus* was present in both hosts with quite similar prevalence. It should be pointed out that the association between *L. segnis* and *M. muris* could be explained on the life-cycle context of the nematode, in which the flea can be involved as intermediate host (Beaucourmu and Chabaud 1963).

In the ecotoxicological aspect, comparing the present results concerning Cd and Pb from insular habitats with those from continental areas reported by Torres *et al.* (2004, 2006) in Catalonia (NE Spain) and using the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), it is worth to emphasize that in Catalonia the detected levels of Cd were higher (around 645 ng g⁻¹ wet weight in kidney) than those found in El Hierro. Relative to Pb, similar values were obtained and no available data exist for Hg in the study performed in Catalonia. On the basis of the present data it can be confirmed that *M. m. domesticus* and *R. rattus* are suitable species to be used as bioindicators of environmental pollution by heavy metals. In addition, the present data may be used to compare this kind of pollution among other islands, especially those of the Canary Archipelago.

In absence of data related to the biology of the most of the detected parasites and respect to the effects of the parasites and the heavy metals on murine hosts in nature, all seem to indicate that, at least in certain periods of the year, the parasite burden could cause an important imbalance on the physiological conditions of these hosts at El Hierro. The specific ecological characteristics of the island (geographical location, physiography, area) could allow the presence of particular endemiotopes like Guinea and Frontera forest. This phenomenon, not denounced until present in other Atlantic islands and unique in Canaries (pers. obs.), could be the beginning of next parasitological, physiopathological and/or toxicological studies on wild fauna from isolated ecosystems.

Acknowledgements. This study was supported by the Spanish projects CGL2006-04937/BOS and CGL2009-07759/BOS of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain, RICET project RD06/0021/0005, and also by the Generalitat of Catalonia (Spain) (2009-SGR-403). Authors wish to thank all personnel at the Centres Cien-

tífics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CC i TUB) for their contribution to the development of the study, the Excmo. Cabildo Insular de El Hierro for its support, and the assistance of Pedro Oromí from the University of La Laguna. A.J.S. Bakhoun benefits from MAEC-AECID doctoral grants (2009-10 0000448019 and 2010-11 0000538055).

References

- Anderson R.C. 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. CABI Publishing, Wallingford.
- Bajer A. 2008. Between-year variation and spatial dynamics of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in naturally infected rodent populations. *Parasitology*, 135, 1629–1649. DOI: 10.1017/S0031182008004952.
- Battersby S., Webster J. 2001. Rat infestations and public health. *Environmental Health*, 4, 109–111.
- Beaucournu J.C., Chabaud A.G. 1963. Infestation spontanée de puces par le spiruride *Mastophorus muris* (Gmelin). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 38, 931–933.
- Beaucournu J.C., Alcover J.A., Launay H. 1989. Les puces (Siphonaptera) des îles Canaries. Description de *Xenopsilla guancha* n. sp. *Vie et Milieu*, 39, 41–48.
- Beaucournu J.C., Launay H. 1990. Les puces de France et du bassin méditerranéen occidental. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris, 548 pp.
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.*, revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583. DOI: 10.2307/3284227.
- Cameron T.M.W. 1949. Diseases carried by house mice. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 17, 9–11.
- Casanova J.C., Miquel J., Fons R., Molina X., Feliu C., Mathias M.L., Torres J., Libois R., Santos-Reis M., Collares-Pereira M., Marchand B. 1996. On the helminthofauna of wild mammals (Rodentia, Insectivora and Lagomorpha) in Azores Archipelago (Portugal). *Vie et Milieu*, 46, 253–259.
- Chabaud A.G. 1954a. Sur le cycle évolutif des Spirurides et de Nématodes ayant une biologie comparable. Valeur systématique des caractères biologiques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 29, 42–88.
- Chabaud A.G. 1954b. Sur le cycle évolutif des Spirurides et de Nématodes ayant une biologie comparable. Valeur systématique des caractères biologiques (suite). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 29, 206–249.
- Chalmers R.M., Sturdee A.P., Bull S.A., Miller A., Wright S.E. 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research*, 83, 478–482. DOI: 10.1007/s004360050283.
- Crompton D.W.T., Nickol B.B. 1985. Biology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, Cambridge, 519 pp.
- Delattre P., Le Louar H. 1981. Dynamique des populations du rat noir *Rattus rattus* en mangrove lacustre. *Mammalia*, 45, 275–288.
- Desportes C., Chabaud A.G., Campana Y. 1949. Sur les Gongyloformes de Muridae et leurs formes larvaires. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 24, 447–459.
- Eira C., Torres J., Vingada J., Miquel J. 2005. Concentration of some toxic elements in *Oryctolagus cuniculus* and in its intestinal cestode *Mosgovoyia ctenoides*, in Dunas de Mira (Portugal). *Science of the Total Environment*, 346, 81–86. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.11.014.
- Evans W.S., Novak M., Basilevsky A. 1985. Effects of environmental temperature, sex, and infection with *Hymenolepis microstoma* on the liver and bile duct weights of mice. *Journal of Parasitology*, 71, 106–109.
- Feliu C., Renaud F., Catzefflis F., Hugot J.P., Durand P., Morand S. 1997. A comparative analysis of parasite species richness of Iberian rodents. *Parasitology*, 115, 453–466. DOI: 10.1017/S0031182097001479.
- Foo C., Farrel J., Bozell A., Robertson I., Ryan U.M. 2007. Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7693–7696. DOI: 10.1128/AEM.00848-07.
- Foronda P., López-González M., Hernández M., Haukisalmi V., Feliu C. 2011. Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain). *Parasites & Vectors*, 4, 185–194. DOI: 10.1186/1756-3305-4-185.
- Franjola R., Soto G., Montefusco A. 1995. Prevalence of protozoa infections in synanthropic rodents in Valdivia city, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología*, 50, 66–72.
- Golvan Y.I., Drouhet E. 1977. Técnicas en Parasitología y Micología. Editorial Jims, Barcelona, 407 pp.
- Gómez M.S., Pujols M., Gállego J. 1988. Sobre la parasitocenosis en *Mus musculus* (Rodentia, Muridae) y *Crocodyrus russula* (Insectivora, Soricidae) del Delta del Ebro: Estudio anual. *Revista Ibérica de Parasitología*, 48, 323–333.
- Gratz N.G. 1994. Rodents as carriers of disease. In: (Eds. A.P. Buckle and R.H. Smith) *Rodent Pests and Their Control*. CAB International, Wallingford, Oxon, 85–1108.
- Hamers T., van der Berg J.H.J., van Gestel C.A.M., van Schooten F.J., Murk A.J. 2006. Risk assessment of metals and organic pollutants for herbivorous and carnivorous small mammal food chains in a polluted floodplain (Biesbosch, The Netherlands). *Environmental Pollution*, 144, 581–595. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.01.020.
- Henriksen S.A., Pohlenz J.F.L. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22, 594–596.
- Higgs S., Nowell F. 2000. Population biology of *Eimeria* (Protozoa: Apicomplexa) in *Apodemus sylvaticus*: a capture/recapture study. *Parasitology*, 120, 355–363. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031>.
- Jimenez A.M. 1992. Contribución al conocimiento de la parasitofauna de micromamíferos de la isla de Córcega. PhD Thesis, University of Valencia, 421 pp.
- Krauss A. 1977. Pathogenicity of *Mastophorus muris* in *Microtus arvalis*. *Angewandte Parasitologie*, 18, 102–103.
- Lowrie F.M., Behnke J.M., Barnard C.J. 2004. Density-dependent effects on the survival and growth of the rodent stomach worm *Protospirura muricola* in laboratory mice. *Journal of Helminthology*, 78, 121–128. DOI: 10.1079/JOH2003230.
- Lv C., Zhang L., Wang R., Jian F., Zhang S., Ning C., Wang H., Feng C., Wang X., Ren X., Qi M., Xiao L. 2009. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China: prevalence and molecular characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7692–7699. DOI: 10.1128/AEM.01386-09.
- Mafiana C.F., Osho M.B., Sam-Wobo S. 1997. Gastrointestinal helminth parasites of the black rat (*Rattus rattus*) in Abeokuta, southwest Nigeria. *Journal of Helminthology*, 71, 217–220.
- Magnanou E., Morand S. 2006. Insularity and micromammal-macroparasite relationships. In: (Eds. S. Morand, B.R. Krasnov and R. Poulin) *Micromammals and Macroparasites: From Evolutionary Ecology to Management*. Springer, Tokyo, Japan, 295–315.
- Mas-Coma S., Esteban J.G., Fuentes M.V., Bargues M.D., Valero M.A., Galan-Puchades M.T. 2000. Helminth parasites of

- small mammals (Insectivores and Rodents) on the Pityusic island of Formentera (Balearic Archipelago). *Research and Reviews in Parasitology*, 58, 125–133.
- Meyer A.N., Shankster A., Langton S.D., Jukes G. 1995. National commensal rodent survey 1993. *Environmental Health*, 103, 127–135.
- Milazzo C., Cagnin M., Di Bella C., Geraci F., Ribas A. 2010. Helminth fauna of commensal rodents, *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia, Muridae) in Sicily. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 69, 194–198.
- Milazzo C., Gouy de Bellocq J., Cagnin M., Casanova J.C., Di Bella C., Feliu C., Morand S., Santalla F. 2003. Helminths and ectoparasites of *Rattus rattus* and *Mus domesticus* from Sicily. *Comparative Parasitology*, 70, 199–204.
- Miquel J., Casanova J.C., Fons R., Feliu C., Marchand B., Torres J., Clara J.P. 1996. Helminthes parasites des Rongeurs Muridés des îles d'Hyères (Var, France): Aspects écologiques. *Vie et Milieu*, 46, 219–223.
- Novak M., McTavish G., Evans W.S. 1985. *Hymenolepis microstoma*: histopathological changes in mice maintained at different environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 71, 735–741.
- Novak M., Nombrodo S. 1988. Mast cells responses to *Hymenolepis microstoma* infection in mice. *Journal of Parasitology*, 74, 81–88.
- Pappas P.W., Schroeder L.L. 1977. Biliary and intestinal pathology in mice infected with *Hymenolepis microstoma*, as determined by scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology*, 63, 762–764.
- Petithory J.C., Theodoris J., Brumpt L. 1997. A challenged Nobel Prize: Johannes Fibiger, 1926. *Histoire des Sciences Médicales*, 31, 87–95.
- Quentin J.C. 1970. Morphogénèse larvaire du Spiruride *Mastophorus muris* (Gmelin, 1790). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 45, 839–855.
- Quentin J.C., Seureau C. 1978. Identification et biologie du Gongylonème parasite du Macroscélide en Tunisie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 53, 631–640.
- Quentin J.C., Seureau C., Sapin J.M. 1986. *Gongylonema congolense* Fain, 1955 (Nematoda, Spirurida), synonymie et biologie larvaire, réactions cellulaires de l'insecte hôte intermédiaire. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72, 227–239. DOI: 10.1007/BF00931150.
- Ritchie L.S. 1948. Another sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of US Army Medical Department*, 8, 326–330.
- Sanchez-Chardi A., Peñarroya-Matutano C., Oliveira C.A., Nadal J. 2007. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere*, 70, 101–109. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.06.047.
- Sheather A.L. 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology*, 36, 266–275.
- Simpson G.F., Gleason L.N. 1975. Lesion formation in the livers of mice caused by metabolic products of *Hymenolepis microstoma*. *Journal of Parasitology*, 61, 152–154.
- Singleton G.R., Hinds L.A., Krebs C.J., Spratt D.M. 2003. Rats, mice and people: rodent biology and management. ACIAR Monograph, 96, Canberra, 564 pp.
- Stephenson L.S., Latham M.C., Ottesen E.A. 2000. Malnutrition and parasitic infestations. *Parasitology*, 121, S23–S38. DOI: 10.1007/S0031182000006491.
- Sturdee A.P., Bodley-Tickell A.T., Archer A., Chalmers R.M. 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 116, 97–113. DOI: 10.1016/S0304-4017(03)00261-9.
- Taraschewski H. 2000. Host-Parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach. *Advances in Parasitology*, 46, 1–179. DOI: 10.1016/S0065-308X(00)46008-2.
- Torres J., Gracenea M., Gomez M.S., Arrizabalaga A., Gonzalez-Moreno O. 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology*, 92, 253–260. DOI: 10.1016/S0304-4017(00)00331-9.
- Torres J., Lapuente J., Eira C., Nadal J. 2004. Cadmium and lead concentrations in *Gallegoides arfaai* (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) from Spain. *Parasitology Research*, 94, 268–270. DOI: 10.1007/s00436-004-1232-3.
- Torres J., Peig J., Eira C., Borrás M. 2006. Cadmium and lead concentrations in *Skrjabinotaenia lobata* (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain). *Environmental Pollution*, 143, 1–5. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.11.012.
- Van Keulen H., Macechko P.T., Wade S., Schaa F.S., Wallis P.M., Erlandsen S.L. 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 108, 97–107. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00181-4.
- Waugh C.A., Lindo J.F., Foronda P., Santana M.A., Lorenzo-Morales J., Robinson R.D. 2006. Population distribution and zoonotic potential of gastrointestinal helminths of wild rats *Rattus rattus* and *R. norvegicus* from Jamaica. *Journal of Parasitology*, 92, 1014–1018. DOI: http://dx.doi.org/10.1645/GE-795.R1.1.
- Webster J.P., Macdonald D.W. 1995. Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology*, 111, 247–255. DOI: 10.1017/S0031182000081804.

(Accepted February 01, 2012)

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

A pesar de existir algunos antecedentes de estudios sobre los parásitos (especialmente helmintos) de otros grupos de mamíferos y aves de Canarias, los realizados en hospedadores silvestres siempre son muy interesantes y especialmente en Murinae, dado el creciente número de investigaciones biológicas y parasitológicas sobre estos roedores en otras partes del mundo. Además, añadir al estudio de los parásitos el de sus hospedadores ha representado un reto importante en la realización de esta tesis.

Los objetivos que pretende la Tesis son:

1. Proporcionar los primeros datos acerca de la parasitofauna de roedores Murinae en las Islas Canarias.
2. Analizar la variación genética de estos hospedadores y algunos de sus parásitos mediante el estudio molecular de distintos marcadores.
3. Entender el origen y la distribución geográfica de dichos hospedadores y sus parásitos mediante el estudio molecular de distintos marcadores genéticos.
4. Averiguar el posible papel de los roedores canarios como reservorios de especies parásitas de interés en salud pública.

3. Metodología

3. METODOLOGÍA

3.1. Muestreo de roedores

Para la realización de los trabajos que se presentan en esta Memoria, se llevaron a cabo muestreos de roedores silvestres (*R. rattus*, *R. norvegicus* y *M. musculus domesticus*) en todas las islas del archipiélago canario y en el islote de La Graciosa. Se prospectaron distintos biotopos, incluyendo mayoritariamente zonas rurales y silvestres (Fig. 5), para lo cual se solicitaron los permisos correspondientes al Área de Medio Ambiente de los Cabildos Insulares.

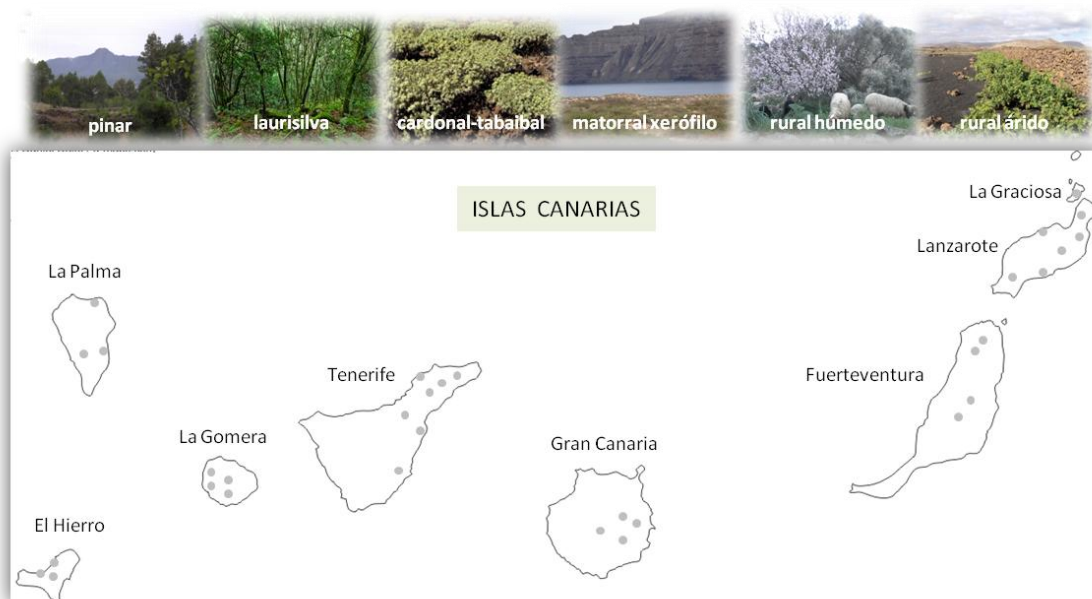


Figura 5. Biotopos más representativos donde se realizaron los muestreos así como localización de las áreas prospectadas para el conjunto de los trabajos presentados.

La captura de los animales se realizó mediante trampas *in vivo* para micromamíferos, cebadas con una mezcla de harina, aceite y sardinas en conserva. Las trampas numeradas se colocaban al anochecer mediante la realización de transectos y distantes entre sí unos 5 m. aproximadamente, tomando los datos de localización

georeferenciada mediante un sistema de posicionamiento global (GPS). Las trampas se revisaban al amanecer los días posteriores para la recolección de los roedores y al atardecer, se procedía a la renovación del cebo.

En total se capturaron 979 animales (244 individuos de *R. rattus*, 14 *R. norvegicus* y 721 *M. m. domesticus*) (Tabla 1). Los trampeos se iniciaron en 2007 en las islas occidentales (Tenerife, La Palma, Gomera y El Hierro) y siguieron a partir de 2010 en las orientales (Gran Canaria, Fuerteventura, Lanzarote y La Graciosa).

Tras la captura de los individuos, éstos eran trasladados al laboratorio para ser analizados en la misma jornada de trabajo. Primero se determinaba específicamente el roedor y después se tomaban datos del peso, longitud, sexo y edad de los individuos, así como de la zona de procedencia. A continuación se asignaba a cada hospedador un código de referencia. Posteriormente eran diseccionados para estudiar la fauna parasitaria.

Tabla 1. Número total de individuos de *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus domesticus* capturados en cada isla del archipiélago canario.

Isla	<i>Rattus rattus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i>
El Hierro	53	0	173
La Palma	16	2	80
La Gomera	17	0	31
Tenerife	94	11	111
Gran Canaria	19	1	41
Fuerteventura	25	0	106
Lanzarote	20	0	137
La Graciosa	0	0	42
Total	244	14	721

3.2. Muestras de parásitos

Una vez diseccionado el roedor, los distintos órganos internos del aparato digestivo, así como el aparato respiratorio, corazón, y vejiga eran separados y observados bajo lupa binocular. Los vermes hallados fueron preservados en viales con etanol al 70% para su identificación morfológica, o en etanol al 100% para su análisis molecular. En el caso de los protozoos las heces del intestino fueron recolectadas y homogeneizadas en viales con

un 2% de dicromato potásico ($K_2 Cr_2 O_7$). Todos los viales eran etiquetados con el código correspondiente, nombre de la especie hospedadora, localidad de captura y órgano de procedencia del parásito. De igual forma los ectoparásitos localizados en el pelaje de los roedores también eran recolectados y depositados en viales en alcohol de 70° para su estudio posterior.

3.3. Identificación morfológica de los parásitos

3.3.1. Protozoos

Los protozoos fueron identificados en el laboratorio mediante el uso de diferentes técnicas:

a) Una fracción de las heces fue analizada para la presencia de *Eimeria*, empleando para ello, con ligeras modificaciones, el método de flotación en solución azucarada de Sheather (Sheather, 1923).

b) Una segunda fracción fue concentrada siguiendo, también con ligeras modificaciones, el método del formol-éter de Ritchie (Ritchie, 1948). Tras ello, parte del sedimento fue fijado con formaldehído al 10% para la detección de *Giardia* bajo observación directa con solución de yodo (Golvan and Drouhet, 1977), mientras que con el resto se realizaron frotis que fueron examinados para la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* mediante tinción de Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen and Pohlenz, 1981).

Los quistes de protozoos fueron estudiados bajo un microscopio Provis AX 70.

3.3.2. Helmintos

Previamente a la identificación morfológica de los helmintos hallados en las vísceras de los hospedadores se utilizaron diferentes técnicas, en función de la Clase:

a) Los nematodos fueron aclarados con lactofenol de Amann y estudiados morfológica y morfométricamente al microscopio óptico.

b) Los cestodos y acantocéfalos fueron teñidos con Carmín Acético Férrico y montados en Bálsamo de Canadá.

3.3.3. Ectoparásitos

Los ectoparásitos fueron tratados con potasa y posteriormente montados en Bálsamo de Canadá para su observación al microscopio.

3.4. Análisis molecular

3.4.1. Extracción de ADN

En el caso de los parásitos, las extracciones de ADN total se llevaron a cabo a partir de individuos enteros en unos casos, o porciones de estos en otros, mediante el kit de extracción Fast DNA (BIO 101 Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En cuanto a los hospedadores, la extracción se realizó a partir de tejido (oreja, cola o hígado) mediante el sistema automatizado Maxwell® 16 Research Instrument System con el kit de extracción Maxwell® 16 MouseTail DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo del fabricante.

En ambos casos, una vez purificado, el ADN fue cuantificado mediante absorbancia a 260 nm y su pureza valorada mediante el cociente de absorbancia 260/280 nm con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Posteriormente el ADN fue almacenado a 4°C hasta su análisis.

3.4.2. Amplificación y secuenciación

Los distintos genes seleccionados fueron amplificados por PCR en un termociclador MJ Research PTC-100 (GMI). Los genes utilizados en cada caso y las condiciones de amplificación de cada uno de ellos se encuentran descritos en los trabajos publicados que se presentan en esta tesis.

Los resultados de las amplificaciones fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,7% (Agarose D1 Low EEO, PRONADISA) en cubetas de desarrollo horizontal (BIO-RAD) y tinción con Bromuro de Etidio. Los productos de PCR fueron posteriormente purificados mediante columnas de afinidad con el kit UltraClean PCR Clean-Up (MO BIO, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ambas cadenas fueron secuenciadas con los mismos cebadores utilizados para su amplificación, en unos casos en la empresa MacroGen Inc. (Korea), y en otros en el Servicio de Secuenciación Genómica de la Universidad de La Laguna (SEGAI) con el Kit Big-dye terminator 3.0, en un secuenciador automático ABI PRISM 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3.4.3. Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas para cada región amplificada fueron editadas con el programa MEGA v5.03 ((Tamura *et al.*, 2011) y posteriormente alineadas con el programa Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el mismo.

En el caso de *Rattus*, los índices de variación haplotípica y nucleotídica fueron calculados con el programa DnaSP v.5.10.1 (Librado and Rozas, 2009). La neutralidad de los datos fue probada mediante los test de Tajima (1989) y Fu and Li (1993) utilizando el mismo software. Las relaciones filogenéticas entre haplotipos fueron inferidas con los métodos basados en probabilidades Maximum Likelihood (ML) e Inferencia Bayesiana (B), empleando los programas Tree-puzzle 5.2 (Schmidt *et al.*, 2002) and MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) respectivamente, bajo el modelo evolutivo HKY +I+G como sugerido por el programa MODELTEST v3.7 (Posada and Crandall, 1998). El soporte de los nodos de los árboles fue calculado mediante los métodos de “quartet puzzling” (100.000 quartets) (Strimmer and Haeseler, 1996), y probabilidad posterior (tras 6.000.000 de generaciones y un burn-in del 25%), respectivamente.

En el caso de *P. cantonensis*, se utilizó el método Neighbor-Joining (NJ), por medio del programa MEGA v5.03 (Tamura *et al.*, 2011). Las confianzas de los nodos fueron obtenidas mediante bootstraps (Felsenstein, 1985).

Por último, para establecer las redes de haplotipos de *R. rattus* y *H. diminuta* se utilizó el algoritmo median-joining network, incluido en el programa NETWORK 4.6.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/>, Bandelt *et al.*, 1999).

3.5. Muestras de hospedadores intermediarios

La toma de muestras de posibles hospedadores intermediarios, tanto moluscos como artrópodos se hizo por captura directa. Posteriormente se diseccionaron y se observaron bajo el microscopio para la detección de posibles fases larvarias de los parásitos.

3.6. Determinación de metales pesados

Para estudiar la presencia de metales pesados (Cd, Hg y Pb) en los tejidos de los hospedadores se tomaron muestras de riñón, hígado y músculo usando instrumental de acero inoxidable y fueron almacenadas -20 °C hasta su análisis. El estudio se realizó a partir de 100 gr de cada muestra en los “Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona”, donde fueron estandarizados los límites de detección y precisión de los resultados. Todas las concentraciones se expresaron como ng/g de peso húmedo.

3.7. Análisis estadístico

Las diferencias de prevalencia entre estaciones de *P. cantonensis* y las diferencias entre islas de la prevalencia de las especies de hymenolepídeos fueron contrastadas mediante el test χ^2 . Para evaluar los niveles de significación al comparar prevalencia y abundancia de los helmintos se emplearon los test de χ^2 , Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

La correlación no-paramétrica de Spearman se utilizó para testar las relaciones entre abundancia de helmintos y la altitud de los biotopos. Los factores que afectan a la abundancia de helmintos fueron calculados mediante modelos lineales generalizados

(MLG) con el programa SPSS Statistics 17.0. La influencia de los parásitos en el peso de las ratas fue calculada con una regresión *lognormal*.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Estudio genético de la rata negra de las Islas Canarias: posible origen y modo de colonización.

Nuestro estudio incluyó *R. rattus* de las Islas Canarias, Europa y África, y *R. norvegicus* de Canarias y Finlandia.

La composición de bases de las secuencias obtenidas fue comparable a las secuencias del citocromo *b* de muridos de otras regiones con un promedio de 31,0% A, 28,6% C, 27,3% y 13,0% T G. El conjunto completo de secuencias presentó 79 posiciones variables y 71 parsimoniosa-informativas a lo largo de los 706 nucleótidos, resultando un total de 9 haplotipos.

Para *R. rattus*, las diversidades nucleotídica y haplotípica fueron muy bajas ($p = 1,18 \times 10^{-3}$, $h = 0,647$); sólo fueron encontradas siete posiciones variables, tres de las cuales fueron parsimoniosa-informativas. Las combinaciones de estas variantes dieron lugar a 7 haplotipos. Los árboles obtenidos (ML y Bayesiano) con estos haplotipos, junto con los de diferentes linajes / grupos de otras regiones del mundo, mostraron la misma topología. Todos los haplotipos canarios, europeos y africanos encontrados en este estudio se agruparon con los pertenecientes al " Grupo A" descrito por Tollenaere *et al.* (2010) y, específicamente, con los del clúster denominado "ship-rat" del "Linaje I" descrito por Aplin *et al.* (2011).

La red de haplotipos mostró una topología en forma de estrella, con el haplotipo Rr1 ocupando la posición central. Este difiere de los demás en un solo paso mutacional, excepto del haplotipo Rr6 de la Península Ibérica, con el que difiere en tres posiciones. Rr1 se encontró en todas las islas excepto Fuerteventura, y fue el único haplotipo detectado en las muestras de Senegal, Benin y Francia. Los haplotipos Rr2 y Rr3 se encontraron sólo en Tenerife y El Hierro, respectivamente. El haplotipo Rr4 fue detectado en El Hierro y Lanzarote, siendo el más frecuente en esta última población. Por último,

Rr5 fue el único haplotipo encontrado en Fuerteventura, y fue detectado también en Lanzarote y Península Ibérica, mientras que Rr7 fue encontrado en Túnez (ver Fig. 6).

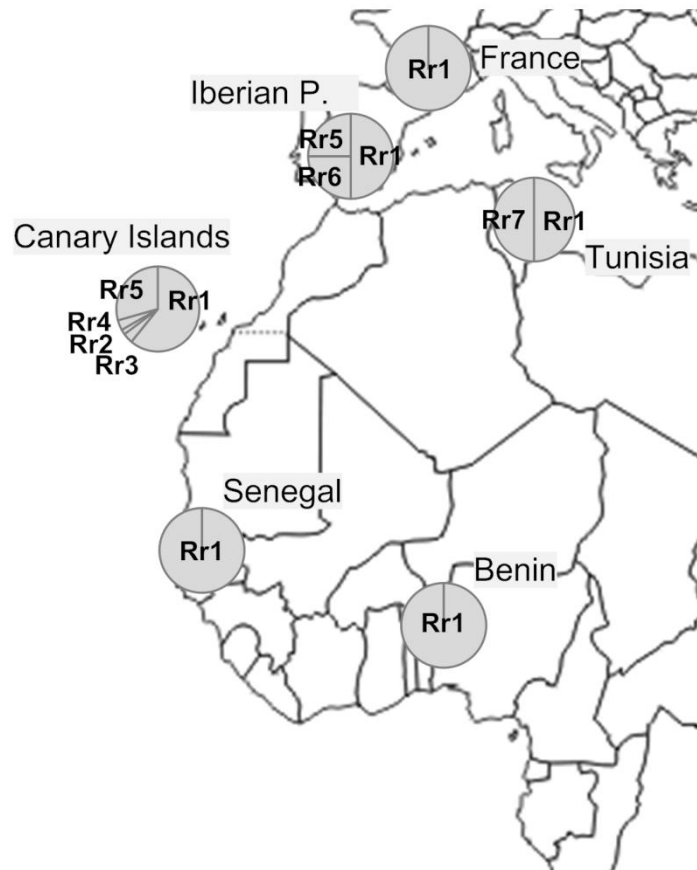


Figura. 6. Localización y composición de haplotipos del citocromo b de *Rattus rattus* en las poblaciones analizadas en este estudio.

Respecto a *R. norvegicus*, tres posiciones fueron polimórficas, dando lugar a dos haplotipos (Rn1 y Rn2) que se agrupan con uno de los linajes encontrado en Sudáfrica para esta especie (Bastos *et al.*, 2011). En nuestras muestras Rn1 fue detectado en Tenerife, Gran Canaria y Finlandia, mientras que Rn2 fue detectado en la isla de La Palma. (datos no publicados).

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista *Biological Invasions* bajo el título “*Genetic characterization of black rat (Rattus rattus) of the Canary Islands: origin and colonization*”. En él se discuten y proponen algunos modos de

colonización de las islas, así como el posible papel de las poblaciones de las islas como fuente de otras poblaciones del mundo.

4.2. Primera cita de *Parastrongylus cantonensis* en rata negra (*Rattus rattus*) de Tenerife

El estudio de los helmintos en *R. rattus*, *R. norvegicus* y *M. m. domesticus* de las islas occidentales del archipiélago canario, dio como resultado el hallazgo de un nematodo pulmonar en el 15% de *R. rattus* de Tenerife. Se detectó una prevalencia del 20% en el foco de mayor infección (Tegueste), aunque en este enclave esta prevalencia no fue homogénea a lo largo del año, mostrando diferencias estacionales significativas, con un máximo del 44% en invierno y un mínimo del 5% en verano.

El análisis morfológico de 20 machos y 20 hembras del nematodo, y el análisis molecular en base a la región completa del ITS-2 y un fragmento de la subunidad pequeña del ARN ribosómico, permitió la asignación de los mismos a la especie *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935). Las secuencias de las muestras canarias no presentaron ninguna posición variable entre ellas, dando lugar a un único haplotipo. Este haplotipo muestra dos sustituciones nucleotídicas con respecto a las secuencias que para este organismo se hallan depositadas en el GenBank, de manera que generan dos posiciones parsimoniosa-informativas. El árbol filogenético obtenido agrupó a los individuos de las Islas Canarias con los de Filipinas, mientras que *P. dujardini* (Drozdz et Doby, 1970), otro helminto pulmonar infestante de roedores en España, formó un clado muy diferente al resto de las especies consideradas.

Por otro lado, el estudio de 5 especies de moluscos como posibles hospedadores intermediarios permitió detectar en dos de ellas larvas en el estadio L3 de nematodos del Orden Metastrongyloidea, sin embargo, el análisis molecular las descartó como *P. cantonensis*.

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista *Acta Tropica* bajo el título “*Finding of Parastrongylus cantonensis (Chen, 1935) in Rattus rattus in Tenerife, Canary Islands (Spain)*”.

4.3. Estudio sobre la distribución y variación genética de hymenolepídeos en murinos de Canarias

En este tercer trabajo se muestrearon murinos de todas las islas del archipiélago y un islote (La Graciosa), pudiendo comparar datos poblacionales de prevalencia, abundancia y riqueza de especies de cestodos Hymenolepididae, así como resultados de diferenciación genética entre distintas poblaciones de estos platelmintos.

Tras analizar alrededor de un millar de roedores Murinae (*R. rattus*, *R. norvegicus* y *M. m. domesticus*), fueron identificadas tres especies de hymenolepídeos: *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819), *Rodentolepis microstoma* (Dujardin, 1845) y *Rodentolepis fraterna* (Stiles, 1906). Mientras que *H. diminuta* en ratas y *R. microstoma* en ratones se encontraron ampliamente distribuidos en el archipiélago, *R. fraterna* sólo fue encontrado en 5 de las islas y con prevalencias muy bajas. Dentro de las islas, las distribuciones no fueron siempre uniformes, destacando que en Fuerteventura y Lanzarote los hymenolepídeos estaban restringidos a la zona centro y norte de la isla, respectivamente, y que en La Graciosa únicamente *R. microstoma* aparecía en hábitats peridomésticos.

Las secuencias obtenidas para el ITS-1 de las tres especies presentaron muy poca o nula variación respecto a las secuencias del GenBank, al igual que las secuencias del COI en *R. microstoma* y *R. fraterna*.

Por otra parte, las redes de haplotipos obtenidas independientemente para cada uno de los tres fragmentos analizados del gen COI de *H. diminuta* (344-403 pb) mostraron que los haplotipos encontrados en Lanzarote y Fuerteventura están estrechamente relacionados entre sí, con un ancestro muy distante del haplotipo más común del resto de las islas. Hasta seis mutaciones (tercer fragmento) separan las islas centro/occidentales de las orientales.

Este estudio ha sido publicado en la revista *Parasites & Vectors* bajo el título “*Distribution and genetic variation of hymenolepidid cestodes in murid rodents on the Canary Islands (Spain)*”.

4.4. Estudio multidisciplinar de los parásitos en murinos de El Hierro.

Este estudio llevado a cabo en *Rattus rattus* y *Mus musculus domesticus* no tiene precedentes en la Islas Canarias, y aportó los primeros datos de biodiversidad parasitaria en murinos del archipiélago. Ello permitió la identificación de tres especies de protozoos, 16 especies de helmintos, dos acantocéfalos, cinco sifonápteros y una especie de anopluro.

En relación a los protozoos detectados, ambos hospedadores se encontraban parasitados por las mismas especies, no encontrándose diferencias significativas entre hospedadores ni entre biotopos.

Los helmintos encontrados en ratones se correspondieron con dos especies de cestodos, seis nematodos y un acantocéfalo. La infección por helmintos en general no fue muy alta y generalmente estaba condicionada por pocas especies. La mayor tasa de infección estuvo concentrada en las áreas de mayor altitud geográfica.

En ratas, la fauna helmintiana estuvo constituida por cuatro especies de cestodos, 10 nematodos y un acantocéfalo. Cuatro de las especies de nematodos fueron atípicas en los parámetros ecológicos (*Mastophorus muris*, *Protospirura* sp., *Streptopharagus greenbergi* y *Gongyлонema neoplasticum*), mostrando unos valores altos tanto de prevalencia como de intensidad. Excepto una de las especies (*M. muris*), las otras tres se encontraron principalmente en biotopos semiáridos cercanos al nivel del mar.

Respecto a los ectoparásitos, se detectaron cinco especies de sifonápteros en ratones, tres de las cuales fueron también aisladas en ratas. Las prevalencias de sifonápteros en general y las cargas parasitarias para las especies comunes no mostraron diferencias significativas entre hospedadores. La única especie de anopluro (*Polyplax spinulosa*) fue encontrada en *R. rattus*.

En cuanto a la presencia de metales pesados en los roedores, se pudo observar que los niveles más altos de Cd, Pb y Hg se localizaban en el hígado de *R. rattus*.

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista *Acta Parasitologica* bajo el título “*Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach*”.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

Debido a la variedad de resultados de esta Tesis hemos considerado oportuno reagrupar la información bajo criterios afines e independientes a la organización por artículos.

5.1. Acerca de aspectos genéticos y biogeográficos

Dado que los datos genéticos y biogeográficos se justifican y relacionan entre sí, hemos unificado y discutido en este apartado los resultados más relevantes a este respecto de las publicaciones I, II y III de la Tesis.

5.1.1. En relación a *Rattus rattus*

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica han sido similares a los encontrados en Madagascar (Hingston *et al.*, 2005; Tollenaere *et al.*, 2010) y Sudáfrica (Bastos *et al.*, 2011), y con los obtenidos por Aplin *et al.* (2011) entre los haplotipos incluidos en el clúster denominado “ship-rat”. De los 7 haplotipos encontrados 4 han sido descritos por primera vez en este trabajo (Rr2, Rr4, Rr6 y Rr7). De los otros tres, el haplotipo Rr1, el más frecuente en el resto del mundo, también lo es en Canarias.

La distribución de los haplotipos en Canarias no fue homogénea, con los haplotipos Rr4 y Rr5 encontrados casi exclusivamente en las islas orientales. La presencia de Rr1 en un área costera, cerca del puerto principal de Lanzarote, sugiere una colonización reciente. Por el contrario, en las islas centrales y occidentales la composición de haplotipos es diferente, caracterizada por la presencia mayoritaria del haplotipo Rr1.

Esta distribución actual de los haplotipos podría estar relacionada con el patrón de colonización del archipiélago canario, en el que las islas orientales fueron las primeras en ser conquistadas. El hecho de que Lanzarote estuviera en contacto con culturas europeas

antes de la conquista de Canarias podría explicar la presencia de un haplotipo (Rr4) diferente al encontrado en Fuerteventura. Su detección en posibles poblaciones fuente mediterráneas podrían apoyar esta hipótesis. Sin embargo el haplotipo Rr5 encontrado en Fuerteventura lo ha sido también en la Península Ibérica, lo que sugiere una colonización posterior de esta isla. Estos datos se verían apoyados por los datos paleontológicos obtenidos por Rando *et al.* (2012), quienes propusieron la introducción de *R. rattus* en Lanzarote antes del 650 AD, probablemente por los romanos, mientras que en Fuerteventura coincidiría con la conquista de las islas. Por otro lado, la extraña presencia del haplotipo Rr4 en El Hierro, la más occidental del archipiélago, podría ser explicada por la conquista “normanda” de esta isla a partir de las islas orientales, principalmente de Lanzarote (Viera y Clavijo, 1772).

La hipótesis de una doble colonización del archipiélago dadas las diferencias entre las dos islas orientales y el resto, ha sido propuesta también para el cestodo *H. diminuta*, tratada en otra de las publicaciones (III) presentada en esta Tesis.

Por último, el análisis molecular de *R. rattus* nos ha permitido establecer el posible papel de Canarias como población fuente de esta especie. La presencia de los haplotipos Rr3 en Guayana y Rr5 en Brazil y la costa oeste de EEUU (Aplin *et al.*, 2011) podría estar relacionada con la migración ilegal acaecida a mediados del s. XX desde Canarias a Venezuela, de la que existen datos contrastados.

Esta Memoria proporciona los primeros datos moleculares de las poblaciones de ratas de las Islas Canarias y de la Península Ibérica, sin embargo un mayor y más amplio muestreo de las poblaciones, principalmente peninsulares, serían necesarios para confirmar nuestras hipótesis.

5.1.2. En relación a *Parastrongylus cantonensis*

El estudio morfológico de los nematodos hallados en *R. rattus* confirmaron que la longitud de las espículas (mayor de 1000 μm), carácter determinante para la diferenciación de las especies del género, se correspondía con *P. cantonensis*. La clasificación fue confirmada por el análisis molecular de dos regiones del ADN (ITS-2 y SSU rRNA).

De acuerdo con Wang *et al.* (2008), las ratas tienen que estar necesariamente establecidas para el establecimiento del ciclo de *P. cantonensis*. En las Islas Canarias ambas especies -*R. rattus* y *R. norvegicus*- han sido introducidas en el archipiélago y están ampliamente distribuidas. Es probable que la llegada de este nematodo a Canarias haya tenido lugar con la introducción de las ratas, aunque por el momento éste sólo ha sido detectado en Tenerife. En este sentido sabemos que la riqueza de helmintos en una isla está relacionada con su superficie (a mayor superficie, mayor biodiversidad), lo que podría explicar por qué *P. cantonensis* se ha encontrado en la mayor de las islas estudiadas.

El primer foco de infección fue detectado en el municipio de Tegueste, un área caracterizada por bosque de laurisilva y zonas agrícolas, cerca de la ciudad de La Laguna. Según Lv *et al.* (2006), la suma de factores ambientales y biológicos podrían determinar las condiciones críticas requeridas por el parásito y sus hospedadores intermediarios para sobrevivir. Todo ello podría estar condicionando la actual distribución de *P. cantonensis* en Tenerife, así como las diferencias significativas entre invierno y verano que hemos encontrado.

La ausencia de capturas de *R. norvegicus* en las zonas donde se ha encontrado *P. cantonensis* no nos permite determinar si esta especie podría ser también hospedadora de este parásito en la isla. La ausencia en *M. m. domesticus*, sin embargo, no hace más que confirmar los datos que indican que esta especie no actúa como hospedador de *P. cantonensis*.

Los rangos de infección de *P. cantonensis* en hospedadores definitivos en regiones endémicas son altamente variables (del 3% al 100%) (Wang *et al.*, 2008). En el caso de Tenerife, el foco más importante tiene una alta prevalencia (20%), similar a regiones como Zhejiang (China) (21%) (Lin and Wang, 2004; Wu, 2006), Indonesia (29%) (Carney *et al.*, 1978), New Orleans (USA) (21%) (Campbell and Little, 1988), Jamaica (27%) (Lindo *et al.*, 2002), y Haití (21%) (Raccurt *et al.*, 2003).

La dispersión de *P. cantonensis* estaría asociada a la expansión por toda África a través de las islas del Pacífico y Sudáfrica, de uno de sus hospedadores intermediarios, el caracol gigante africano *Achatina fulica*, considerado el principal vector del nematodo (Kliks and Palumbo, 1992). Hasta ahora, esta especie no ha sido citada en Canarias, pero

otros invertebrados podrían actuar como hospedadores intermediarios o paraténicos, ya que la mayoría de las especies de moluscos son susceptibles de serlo y capaces de transmitir *P. cantonensis* (Cross and Chen, 2007; Ibrahim, 2007; Lv *et al.*, 2008). La búsqueda de posibles hospedadores intermediarios permitió la detección de larvas en dos especies de moluscos endémicos de Tenerife, *Hemicycla bidentalis* y *Plutonia lamarckii* (Izquierdo *et al.*, 2004), pero las secuencias del ITS-2 de las mismas no se correspondieron con *P. cantonensis* (Caldeira *et al.*, 2003).

La trascendencia de este trabajo radica en ser la primera cita de esta especie en las Islas Canarias, por lo que la distribución global de este parásito debería ser revisada. Es relevante también por ser una nueva contribución a la distribución en islas, además de las islas del Pacífico y del Caribe (Wang *et al.*, 2008). Además, estudios posteriores han aportado nuevos datos sobre la presencia de *P. cantonensis* y ampliado su distribución dentro de la isla de Tenerife (Foronda *et al.*, 2011a; Martín-Alonso *et al.*, 2011).

5.1.3. En relación a cestodos Hymenolepididae

Uno de los principales resultados a discutir del tercer trabajo presentado en esta Tesis ha sido la amplia distribución mostrada por *H. diminuta* y *R. microstoma* en el archipiélago, y la más reducida distribución de *R. fraterna*.

Las ausencias de *R. fraterna* en La Gomera, Fuerteventura y La Graciosa, y de *R. microstoma* en Gran Canaria podrían ser debidas, por un lado, a un posible efecto fundador y, por otro, a distintos factores bióticos y abióticos. Esta hipótesis ha sido ya planteada para explicar la pérdida de helmintos en otros vertebrados introducidos en Canarias (ver Foronda *et al.*, 2003; López-Darias *et al.*, 2008). El caso contrario ocurre con *H. diminuta*, especie que ha sido encontrada en todas las islas del archipiélago (a excepción de La Graciosa) a pesar de presentar un ciclo de vida complejo, que necesita obligatoriamente de la presencia de un hospedador intermediario.

Sin embargo, el carácter cosmopolita de estos cestodos junto a la elevada variedad de especies de artrópodos que pueden actuar como hospedadores intermediarios, y la presencia confirmada de muchas de ellas en Canarias, podría explicar el éxito del establecimiento de estos parásitos en el Archipiélago.

Además, el análisis genético del COI de *H. diminuta* merece una mención especial, al mostrar grandes diferencias entre los haplotipos de las islas orientales, con un ancestro común, y el haplotipo central de las islas centro/occidentales del archipiélago. Las distancias genéticas observadas indican una gran separación en el tiempo que podría ser explicada por uno o varios eventos de colonización del parásito. En el primer caso, posteriormente a la llegada de *H. diminuta* un reducido o nulo flujo génico entre las islas orientales y el resto (Fig. 7A) podría haber generado una profunda separación de los linajes. La segunda hipótesis que planteamos propone dos eventos diferentes para ambos grupos de islas (Fig. 7B).

No obstante, aunque no contemplada en el artículo publicado, podría existir una tercera posibilidad para explicar la distancia existente entre los haplotipos de Lanzarote y Fuerteventura, y el resto. Se basa en la existencia del cestodo en estas islas, previa a la colonización de las ratas, teniendo como hospedador al roedor extinto *Malpaisomys insularis* (Fig. 7C).

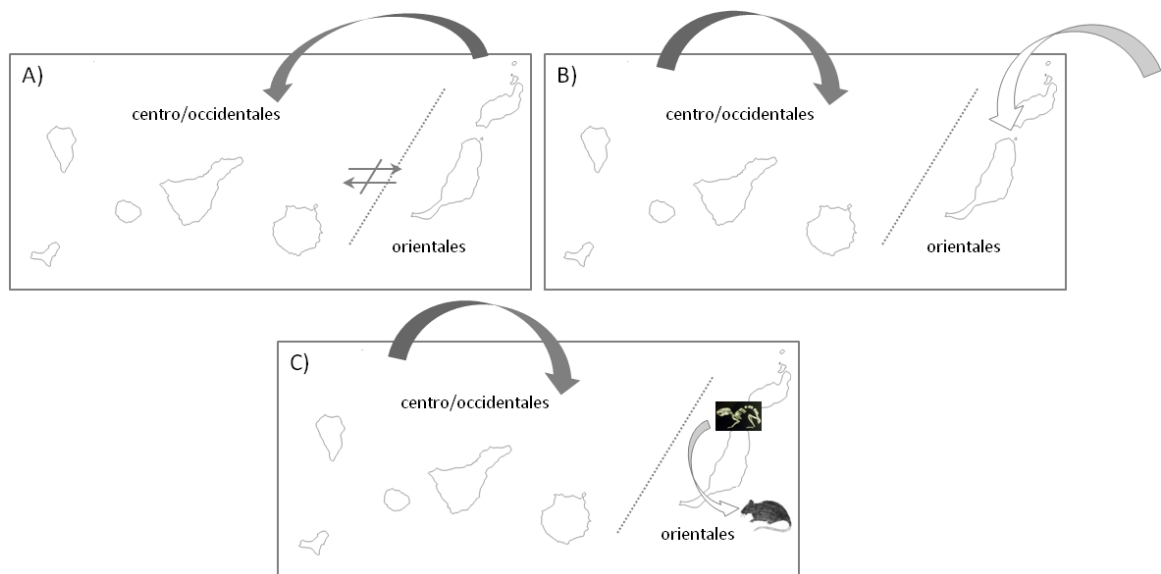


Figura 7. Hipótesis de colonización de las Islas Canarias por *Himenolepis diminuta*. A) Un único evento colonizador y reducido flujo génico posterior entre las orientales y centro/occidentales; B) Dos eventos colonizadores diferentes para cada grupo de islas; C) Paso de un posible cestodo del roedor endémico extinto *Malpaisomys insularis* (imagen obtenida de <http://flickrhivemind.net>) a *Rattus rattus*, diferente de las islas centro/occidentales.

La relación inusual entre un roedor foráneo y un parásito nativo (Asakawa, 2005) se podría haber producido por la coexistencia de ambos hospedadores y la posterior extinción del roedor endémico. Casos similares han sido citados en bivalvos introducidos (Krakau *et al.*, 2006) o incluso en ratas (Asakawa, 2005).

5.2. Acerca de aspectos faunísticos

En relación a los aspectos faunísticos de la Tesis, la discusión se hará en base a los datos derivados del estudio multidisciplinar llevado a cabo con murinos de El Hierro (trabajo IV), en concreto con *Rattus rattus* y *Mus musculus domesticus*. Del global de especies parásitas que dicho trabajo ha permitido elucidar nos parece oportuno comentar tan sólo los aspectos relativos a los helmintos. Este planteamiento está basado en la ausencia de datos en relación a protozoos y ectoparásitos de murinos en ecosistemas insulares, dato que se contrapone a la abundante información helmintológica aparecida en numerosos estudios precedentes llevados a cabo con estos hospedadores en islas mediterráneas (Esteban, 1983; Mas-Coma and Feliu, 1984; Mas-Coma *et al.*, 1987, 2000; Mas-Coma y Esteban 1988; Galán-Puchades *et al.*, 1989; Fuentes, 1992; Jiménez, 1992; de Belloq *et al.*, 2003; Milazzo *et al.*, 2003) y atlánticas (Waugh *et al.*, 2006; Resendes *et al.*, 2009).

En las Tablas 2 y 3 se especifican las vermifaunas de *R. rattus* y *M. m. domesticus* respectivamente, en 9 islas mediterráneas (Formentera, Ibiza, Menorca, Mallorca, Córcega, Sicilia, Porquerols, Port-Cros y Levant) y 4 atlánticas (Sao Miguel, Terceira, Flores y El Hierro) según trabajos ya publicados (Casanova *et al.*, 1996; Miquel *et al.*, 1996; Mas-Coma *et al.*, 1998, 2000; Milazzo *et al.*, 2003, 2010) y los de la presente Memoria. La ausencia de datos concretos relativos a la estructura de las helmintofaunas de ambos roedores en otras islas canarias obliga por tanto a focalizar la discusión a los resultados hallados en El Hierro.

5.2.1. En relación a *Rattus rattus*

En El Hierro la vermifauna de la rata negra (*R. rattus*) ha quedado constituida por 15 especies de helmintos (4 cestodos -dos en fase larvaria-, 10 nematodos y 1 acantocéfalo). Desde un aspecto cualitativo, la parasitofauna de este murino aparece enriquecida, pues solamente en Córcega se ha detectado un número de especies superior (17). Al respecto cabe tener en cuenta que las prospecciones en Córcega han sido mucho más reiteradas (Jiménez, 1992) y que su superficie es mucho mayor que la de El Hierro, con lo que las posibilidades de detectar más especies parásitas en el hospedador se han visto incrementadas (Mas-Coma y Feliu, 1984). En el conjunto de islas de la Macaronesia, la composición cualitativa en El Hierro representa el mayor número de especies de helmintos detectado en una isla hasta la actualidad, tanto en relación a datos publicados (Casanova *et al.*, 1996) como a resultados no publicados, aunque conocidos (en la isla de Santiago -la mayor del archipiélago de Cabo Verde- solamente se han determinado 3 especies de helmintos; Feliu, datos no publicados).

Uno de los resultados más llamativos es el concerniente a la ausencia de trematodos digénidos, referido tanto a la vermifauna de *R. rattus* como a la de *M. musculus*. Estos platelmintos han estado presentes en ambos hospedadores en Baleares, Córcega, Sicilia, islas Hyères y Azores, por lo que su ausencia en Canarias resulta sorprendente. Datos no publicados relativos a las helmintofaunas de ambos roedores en todas las islas de Canarias, tan sólo han permitido detectar una especie de Brachylaimidae en un biotopo muy focalizado de Tenerife y parasitando a *R. rattus*. Esta Familia de digénidos parece ser la única relacionada con micromamíferos canarios, a tenor de otro hallazgo de *Brachylaima* sp. en ardillas morunas de Fuerteventura (López-Darias *et al.*, 2008). Además, en insectívoros y lagomorfos canarios tampoco se han detectado especies de digénidos, al menos hasta el presente. Si se considera la naturaleza de los biotopos prospectados en El Hierro, y se compara con los sondeados en trabajos llevados a cabo en ecosistemas insulares con presencia de digénidos, es difícil entender desde un punto de vista bioecológico la ausencia de estos platelmintos entre nuestros hospedadores de El Hierro.

En lo que concierne a la cestodofauna de la rata negra en El Hierro, las especies parásitas detectadas son las más habituales en este hospedador, tanto en islas como en biotopos peninsulares/continentales (Feliu *et al.*, 1997). Una de las especies halladas

(*Hymenolepis diminuta*) forma parte del grupo de especies parásitas omnipresentes en los ecosistemas insulares en los que se ha estudiado la parasitofauna de *R. rattus* (ver Tabla 2). En este grupo cabe incluir también a los nematodos *Mastophorus muris* y *Syphacia muris*. Ampliamente distribuidas con *R. rattus* en islas del atlántico y mediterráneo aparecen otras dos especies, la fase larvaria de *Taenia taeniaeformis* y el nematodo *Trichuris muris*. De todas estas especies, tan sólo *S. muris* es un helminto oioxeno de la rata negra, lo que explica su evolución paralela con el hospedador. En el resto de especies parásitas su especificidad es menos estricta, aunque la rata negra aparece como un hospedador habitual en todas ellas. Al respecto cabe citar a tres especies de nematodos (*Aonchotheca annulosa*, *Aspiculuris tetraptera* y *Nippostrongylus brasiliensis*), no detectadas en El Hierro, y que habitualmente han constituido parte de la vermifauna de la rata negra en islas (Tabla 2). *Aonchotheca annulosa*, hallada en el Mediterráneo y la Macaronesia, se ha observado en ratas en Tenerife, aunque con una distribución focalizada (datos no publicados). La ausencia de la segunda especie es menos sorprendente, aunque tampoco se ha encontrado en el ratón casero, un hospedador también habitual. Su ciclo biológico, tipo nematodo monoxeno pseudogeohelminto, hace que su presencia en islas esté limitada a enclaves con una temperatura y humedad determinadas, condiciones que no se dan en todas ellas. En cuanto a *N. brasiliensis*, un nematodo propio de la rata negra, su ausencia en El Hierro es biológicamente inexplicable, máxime cuando se ha citado en otras islas de la Macaronesia (Casanova *et al.*, 1996) y detectado en Tenerife (datos no publicados).

Desde un prisma zoogeográfico hay algunos hallazgos de nematodos infestantes de *R. rattus* en El Hierro que cabe destacar. El primero se refiere al helminto *Calodium hepaticum*, una especie eurixena que solo aparece esporádicamente en este hospedador en la mayoría de territorios continentales (Feliu *et al.*, 1997), y en cambio parece muy distribuida por islas de la Macaronesia (Azores y Canarias). En el archipiélago canario se ha detectado en casi todas las islas, en algunos casos con una prevalencia de infestación alta en ciertos enclaves (65,3% en Breña Baja, isla de La Palma, datos no publicados). No cabe duda que el dato más sorprendente es la alta frecuencia de aparición de especies estomacales en las ratas de El Hierro (*G. neoplasticum*, *M. muris*, *S. greenbergi*, *Protospirura* sp.), algunas de las cuales se constituyen como especies dominantes en el espectro parasitario de este hospedador en la isla, con porcentajes de infestación que fluctúan entre el 17,0% para *G. neoplasticum*, y el 35,8% para *S. greenbergi*. Estos

resultados no tienen precedentes en otras zonas continentales/insulares y tan solo se asemejan a ciertas helmintofaunas de *R. rattus* en zonas semidesérticas del Norte de África (Jiménez, 1992; Feliu *et al.*, 1997). Los enclaves donde se encontraron nuestras ratas correspondían a biotopos de naturaleza xerófila y de características parecidas a los biotopos del Atlas (Seurat, 1917; Bernard, 1963, 1964, 1966).

En relación a la helmintofauna de la rata negra cabe comentar finalmente la detección en El Hierro de *Moniliformis moniliformis*, una especie ocasional en *Rattus* en Iberia (Cordero del Campillo *et al.*, 1994) y que únicamente se ha detectado en Córcega en otros ecosistemas insulares (Tabla 2). La prevalencia ha sido importante (26,4%) y todavía más la intensidad de parasitación (entre 30,7 y 119,4 individuos del parásito por rata infestada). Sin embargo, estudios faunísticos recientemente llevados a cabo en Benin y Cabo Verde han detectado con cierta frecuencia este acantocéfalo en *R. rattus* (Feliu, com. pers.), con lo que es probable que el parásito presente un área de distribución ligada al murino. De hecho, *M. moniliformis* ha sido detectado en otras islas canarias (La Palma, Lanzarote), si bien con prevalencias y cargas parasitarias inferiores (datos no publicados).

5.2.2. En relación a *Mus musculus domesticus*

En lo que concierne a la helmintofauna del ratón, es evidente un empobrecimiento cualitativo, dado que en un grupo importante de islas (Formentera, Córcega, Sicilia, Terceira y Flores) el número de especies vermidianas ha sido superior (ver Tabla 3). En la Macaronesia, tan sólo el ratón casero de Sao Miguel ha presentado una fauna de helmintos cualitativamente igual. En otras islas canarias el espectro helmintiano de *Mus* se presenta ligeramente más rico, sobre todo por la presencia de nematodos heligmosómidos en islas occidentales (Tenerife, La Palma) o por la alta prevalencia de *Gongylonema brevispiculum* en las orientales (Lanzarote, Fuerteventura, La Graciosa) (datos no publicados). En este sentido resulta sorprendente la ausencia de *Heligmosomoides polygyrus* en El Hierro, dada la similitud de ciertos biotopos prospectados en la isla con los sondeados en otros enclaves de islas occidentales en donde ha aparecido el nematodo. En cambio, la ausencia de *G. brevispiculum* no es tan sorprendente. Esta especie ha aparecido en islas orientales en biotopos con escasa humedad y abundantes poblaciones de invertebrados (posibles hospedadores

intermediarios), y en El Hierro no se ha trampeado en enclaves de esta naturaleza. En El Hierro la presencia de *T. taeniaeformis larvae* y *Syphacia obvelata* corrobora a estas dos especies como las prioritariamente presentes en *Mus* de ecosistemas insulares del Mediterráneo y Atlántico (Tabla 3). Dado el carácter oioxeno del nematodo, es lógico que ello sea así.

Entre la cestodofauna de *M. m. domesticus* en El Hierro destaca especialmente la detección de *Rodentolepis microstoma*, un platelminto propio de este hospedador y muy habitual en territorio peninsular/continental, pero que de manera extraña sólo ha aparecido en la isla de Sicilia. Siendo la especie dominante en El Hierro (27,2% de prevalencia), el dato destaca de manera especial porque no es frecuente que un cestodo se detecte como la especie más prevalente. No obstante, también es cierto que su distribución ha sido focal, en la zona de la laurisilva de dicha isla, y que se ha observado una clara influencia estacional en el momento de detectar la especie, ya que al principio de otoño es cuando se notó el mayor porcentaje de infestación en ratones (57,7%).

En relación a la fauna de nematodos merece la pena comentar dos aspectos, tanto en *Mus* como en *Rattus*. El primero se refiere al hallazgo de *Mastophorus muris* y el segundo a la detección de rictuláridos sin especificar. El nematodo estomacal *M. muris* ha sido considerado durante mucho tiempo un parásito eurixeno citado en numerosas especies de Mamíferos (Anderson, 1992; Feliu *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios moleculares con individuos aislados de *Rattus* y *Mus* de El Hierro y otras islas canarias han demostrado diferencias significativas entre las poblaciones de *M. muris* de uno y otro hospedador. A tenor de los estudios todavía en vigor con este material, es muy probable que estemos frente a dos especies, indistinguibles morfológicamente. Considerando las numerosas denuncias de *M. muris* en todo el mundo, se antoja realmente muy difícil elucidar que citas corresponderían con la descripción de la especie, descrita morfológicamente desde hace ya más de 200 años. En cuanto a la catalogación, tanto en *Rattus*, como en *Mus*, de *Rictularia* sp., la inespecificidad de la determinación se ha debido a la ausencia de machos entre el material parasitario recolectado. A partir de las hembras detectadas, es evidente, no obstante, que la especie de Canarias no es *Rictularia proni*, frecuente en roedores y carnívoros de la Región Paleártica y citada en múltiples ocasiones en la Península Ibérica (Feliu, 1980).

La fase larvaria del acantocéfalo *Prosthynchus cylindraceus*, detectada en el ratón casero de El Hierro, constituye un ejemplo de hospedador paraténico, que curiosamente sólo se ha detectado en otra isla (Córcega). Parásito relativamente frecuente en distintas especies de aves (Cordero del Campillo *et al.*, 1994) su presencia en ciertas islas está relacionada con las especiales condiciones ecológicas de las mismas, que en biotopos concretos favorecen la presencia de especies parásitas en hospedadores no habituales (Mas-Coma y Feliu, 1984). Ello explicaría también la ausencia del acantocéfalo en biotopos continentales (Feliu *et al.*, 1997).

Tabla 2. Listado de especies de distintos grupos de helmintos encontradas en *Rattus rattus* de diferentes islas mediterráneas y atlánticas (datos obtenidos de Casanova *et al.*, 1996; Miquel *et al.*, 1996; Mas-Coma *et al.*, 1998; Mas-Coma *et al.*, 2000; Milazzo *et al.*, 2003; Milazzo *et al.*, 2010; presente Memoria).

HOSPEDADOR: <i>Rattus rattus</i>		BALEARES				HYERES			AZORES			CANARIAS		
PARÁSITO		F	I	ME	MA	C	S	P	PC	L	SM	T	FL	H ^a
TREMATODA	<i>Brachylaima</i> sp.	*	*			*	*	*			*	*		
	<i>Corrigia</i> sp.					*								
	<i>Dollfusinus frontalis</i>	*												
	<i>Fasciola hepatica</i>					*								
CESTODA	<i>Hymenolepis diminuta</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Hymenolepis fraterna</i>							*						*
	<i>Hymenolepis</i> sp.					*								
	<i>Hymenolepis straminea</i>	*		*		*								
	<i>Mesocestoides</i> sp. larvae	*				*								*
	<i>Rodentolepis nana</i>						*							
	<i>Taenia taeniaeformis</i> larvae			*		*		*	*	*				*
	<i>Aonchotheca annulosa</i>				*	*		*			*	*	*	
	<i>Aonchotheca muris sylvatici</i>							*	*					
	<i>Aspicularis tetraptera</i>	*	*			*	*							
NEMATODA	<i>Calodium hepaticum</i>			*			*				*	*	*	*
	<i>Cyathospirura seurati</i>	*												
	<i>Eucoleus gastricus</i>						*					*		
	<i>Gongylonema neoplasticum</i>				*							*		*
	<i>Gongylonema</i> sp.			*										
	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>			*										
	<i>Heterakis spumosa</i>			*			*				*	*	*	*
	<i>Mastophorus muris</i>		*	*	*	*	*	*	*	*				*
	<i>Nematoda</i> gen. spp. larvae	*												
	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>					*	*				*	*	*	
	<i>Physaloptera getula</i>	*												
	<i>Physaloptera</i> sp.		*											
	<i>Protospirura</i> sp.													*
	<i>Rictularia proni</i>	*		*										
	<i>Rictularia</i> sp.													*
	<i>Seuratium cadarachense</i>	*												
	<i>Spiruridae</i>	*											*	
<i>Streptopharagus kutassi</i>	*	*												
<i>Streptopharagus greenbergi</i>													*	
<i>Syphacia muris</i>	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	
<i>Trichosomoides crassicauda</i>			*		*								*	
<i>Trichuris muris</i>	*	*	*	*	*						*		*	
ACANTHOCEPHALA														
<i>Acanthocephalan</i> sp.						*	*							
<i>Moniliformis moniliformis</i>						*								*

(*) Presencia (^a) Presente estudio

F: Formentera; I: Ibiza; ME: Menorca; MA: Mallorca; C: Corcega; S: Sicilia; P: Porquerolles; PC: Port-Cros; L: Levant; SM: Sao Miguel; T: Terceira; F: Flores; H: El Hierro.

Tabla 3. Listado de especies de distintos grupos de helmintos encontradas en *Mus musculus* de diferentes islas mediterráneas y atlánticas (datos obtenidos de Casanova *et al.*, 1996; Miquel *et al.*, 1996; Mas-Coma *et al.*, 1998, 2000; Milazzo *et al.*, 2003, 2010; presente Memoria).

HOSPEDADOR: <i>Mus musculus</i>		BALEARES				HYERES			AZORES			CANARIAS		
PARÁSITO		F	I	ME	MA	C	S	P	PC	L	SM	T	FL	H ^a
TREMATODA	<i>Brachylaima</i> sp.	*	*	*		*	*	*			*	*		
	<i>Corrigia</i> spp.					*		*						
	<i>Fasciola hepatica</i>					*								
	<i>Skrjabinocoelus</i> sp.										*			
	<i>Zonorchis</i> sp.					*								
CESTODA	<i>Catenotaenia pusilla</i>	*			*	*	*							
	<i>Catenotaenia</i> sp.	*												
	<i>Cladotaenia globifera</i> larvae											*		
	<i>Hymenolepis diminuta</i>					*	*				*	*	*	
	<i>Hymenolepis</i> sp.	*												
	<i>Rodentolepis microstoma</i>							*						*
	<i>Rodentolepis nana</i>							*						
	<i>Rodentolepis straminea</i>					*						*		
	<i>Mesocestoides</i> sp. larvae	*												
	<i>Paranoplocephala</i> sp.					*								
	<i>Taenia taeniaeformis</i> larvae	*	*		*	*	*					*		*
	<i>Aonchotheca annulosa</i>					*						*	*	
	<i>Aspicularis tetraptera</i>	*				*	*							
<i>Calodium hepaticum</i>					*	*				*	*	*		
<i>Eucoleus bacillatus</i>					*									
<i>Eucoleus gastricus</i>							*			*	*	*		
<i>Gallegostrongylus ibicensis</i>		*												
<i>Gongylonema musculi</i>							*							
<i>Gongylonema</i> sp.	*	*	*				*							
NEMATODA	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>					*	*							
	<i>Heterakis spumosa</i>						*				*	*	*	*
	<i>Mastophorus muris</i>					*	*				*	*	*	*
	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>						*				*	*		
	<i>Physaloptera getula</i>	*												
	<i>Protospirura</i> sp.													*
	<i>Rictularia</i> sp.													*
	<i>Syphacia obvelata</i>	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	*
	<i>Syphacia muris</i>						*							
	<i>Spiruroidea</i> gen. spp. larvae	*												
	<i>Trichuris muris</i>	*						*			*			*
	<i>Nematoda</i> sp.										*			
	ACANTHOCEPHALA													
<i>Acanthocephala</i> gen. sp.														
<i>Prosthorhynchus cylindraceus</i> larvae														

(*) Presencia ^(a) Presente estudio

F: Formentera; I: Ibiza; ME: Menorca; MA: Mallorca; C: Corcega; S: Sicilia; P: Porquerolles; PC: Port-Cros; L: Levant; SM: Sao Miguel; T: Terceira; F: Flores; H: El Hierro.

5. 3. Acerca de aspectos medioambientales y de salud pública

En este apartado destacaremos el posible papel de los parásitos y hospedadores estudiados en relación a la salud humana y medioambiental, comentando los resultados obtenidos de las publicaciones II, III y IV.

La presencia de *P. cantonensis* en Tenerife podría tener importancia desde el punto de vista de la salud pública, ya que puede causar meningitis eosinofílica o angiostrongyliasis neurológica (Kliks and Palumbo, 1992; Senanayake *et al.*, 2003). Por esta razón, la educación en higiene, inspección y vigilancia de los alimentos son necesarias para prevenir brotes potenciales de angiostrongyliasis. Serían necesarias más investigaciones en otras áreas para determinar la distribución de especies potencialmente zoonóticas así como posibles hospedadores accidentales/paraténicos, y para la detección de nuevos focos potenciales de transmisión de *P. cantonensis*.

Por otro lado, la presencia de especies zoonóticas como *H. diminuta*, *R. microstoma* y *R. fraterna* podría suponer un cierto riesgo para la salud humana. Sin embargo, el hecho de que sólo *H. diminuta* muestre una alta prevalencia en ratas, y que la distribución de algunas de las especies en ciertas islas sea muy localizada, disminuye el riesgo de contagio al hombre.

En cuanto a la presencia de metales pesados en parásitos y hospedadores, los niveles de Cd registrados por Torres *et al.* (2004) en *Apodemus sylvaticus* de Cataluña fueron más altos que en los murinos de la isla de El Hierro. Los niveles de Pb fueron similares y no existen datos en Cataluña respecto al Hg. Los datos confirman la utilidad *M. m. domesticus* y *R. rattus* como bioindicadores de contaminación ambiental por metales pesados, y pueden ser utilizados para la comparación con el resto de las islas.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

El estudio de los roedores Murinae silvestres de las Islas Canarias y de sus helmintos parásitos ha proporcionado como conclusiones más destacables las siguientes:

- 1) La rata negra (*Rattus rattus*) presente en las Islas Canarias pertenece al Linaje I, concretamente al clúster denominado “ship-rat”, que proviene de la dispersión europea.
- 2) La distribución de los haplotipos de *R. rattus* en el archipiélago se explicaría con la hipótesis de una doble colonización, que diferencia las islas orientales de las centro/occidentales y que estaría ocasionada por el modelo de conquista que tuvo lugar en las islas.
- 3) La presencia de *Parastrongylus cantonensis* en *Rattus rattus* constituye la primera cita en Canarias y en Europa, y confirma los datos de expansión de este parásito por distintos continentes, a partir de su centro de origen asiático.
- 4) Los cestodos hymenolepídidos parásitos de Murinae son helmintos frecuentes en las Islas Canarias. *Hymenolepis diminuta* es el cestodo más ampliamente distribuido en el archipiélago. Los haplotipos encontrados en esta especie sugieren también una doble colonización, que dividiría las islas en dos grupos, las orientales y las centro/occidentales.
- 5) Esta Memoria aporta el primer estudio parasitario multidisciplinar realizado en ratas y ratones de Canarias (concretamente en El Hierro), y podría servir de modelo para su aplicación al resto de las islas. El estudio proporciona datos taxonómicos, faunísticos, ecológicos, biológicos, ecotoxicológicos y fisiopatológicos.
- 6) Considerando los datos parasitológicos ya conocidos en el conjunto de islas de la Macaronesia, la composición cualitativa de la helmintofauna de *Rattus. rattus* de El Hierro representa la mayor diversidad parasitaria detectada hasta el presente en una isla macaronésica.

- 7) La presencia de *Parastrongylus cantonensis* en Canarias constituye un factor de riesgo para la salud pública, dada la prevalencia de infestación del verme en el foco detectado en Tenerife. Sin embargo, los porcentajes de infestación encontrados para las especies eurixenas de Hymenolepididae y su área de distribución, no parecen suponer un peligro potencial para el hombre.

- 8) Se confirma la utilidad de los roedores Murinae (*Rattus/Mus*) y de sus cestodos/acantocéfalos parásitos como bioindicadores de la contaminación ambiental por metales pesados. Este tipo de binomio es de máximo interés si tenemos en cuenta que mayoritariamente los modelos utilizados hasta el presente procedían de hospedadores acuáticos.

7. Referencias

7. REFERENCIAS

- Abdelkrim J, Pascal M, Samadi S. 2005. Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Molecular Ecology* 14: 2923-2931.
- Acha PN, Szyfres B. 2003. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*, 3rd ed. PanAmerican Health Organization, 395 pp.
- Alcover JA, Rando JC, García-Talavera F, Hutterer R, Michaux J, Trias M, Navarro JF. 2009. A reappraisal of the stratigraphy of Cueva del Llano (Fuerteventura) and the chronology of the introduction of the house mouse (*Mus musculus*) into the Canary Islands. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 277: 184-190.
- Anderson RC. 1992. *Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission*. CABI Publishing, Wallingford, 578 pp.
- Aplin KP, Suzuki H, Chinen AA, Chesser RT, ten Have J, Donnellan SC, Austin J, Frost A, Gonzalez JP, Herbreteau V, Catzefflis F, Soubrier J, Fang Y-P, Robins J, Matisoo-Smith E, Bastos ADS, Maryanto I, Sinaga MH, Denys C, Van Den Bussche RA, Conroy C, Rowe K, Cooper A. 2011. Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of black rats. *PLoS ONE* 6(11): e26357. doi:10.1371/journal.pone.0026357.
- Asakawa M. 2005. Perspectives of host-parasite relationships between rodents and nematodes in Japan. *Mammal Study* 30: S95-S99.
- Avise J. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447 pp.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bastos AD, Nair D, Taylor PJ, Brettschneider H, Kirsten F, Mostert E, von Maltitz E, Lamb JM, van Hoof P, Belmain SR,

- Contrafatto G, Downs S, Chimimba CT. 2011. Genetic monitoring detects an overlooked cryptic species and reveals the diversity and distribution of three invasive *Rattus* congeners in South Africa. *BMC Genetics* 12: 26.
- Battersby S, Webster J. 2001. Rat infestations and public health. *Environmental Health* 4: 109-111.
- Bernard J. 1963. Etudes sur la faune parasitaire de Tunisie. Nématodes parasites des Muridae. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 40: 5-64.
- Bernard J. 1964. Nématodes des micromammifères récoltés dans le Marais Vendéen. *Vie et Milieu* 15(2): 451-456.
- Bernard J. 1966. Contribution à la connaissance de la faune helminthologique d'Afrique du Nord. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 43: 163-182.
- Caldeira RL, Carvalho OS, Mendoza CLFG, Graeff-Teixeira C, Silva MCF, Ben R, Maurer R, Lima WS, Lenzi HL. 2003. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 1039-1043.
- Callejón R, de Rojas M, Nieberding C, Foronda P, Feliu C, Guevara D, Cutillas C. 2010. Molecular evolution of *Trichuris muris* isolated from different Muridae hosts in Europe. *Parasitology Research* 107: 631-641.
- Cameron TMW. 1949. Diseases carried by house mice. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 17: 9-11.
- Campbell BG, Little MD. 1988. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. *American Journal of Tropical Medicine* 38: 568-573.
- Carney WP, Stafford EE, Purnomo, Tanudjaja S. 1978. Angiostrongyliasis in Indonesia: additional geographic and host occurrence records. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 9: 516-519.
- Casanova JC, Miquel J, Fons R, Molina X, Feliu C, Mathias ML, Torres J, Libois R, Santos-Reis M, Collares-

- Pereira M, Marchand B. 1996. On the helminthfauna of wild mammals (Rodentia, Insectivora and Lagomorpha) in Azores Archipelago (Portugal). *Vie et Milieu* 46: 253-259.
- Castillo A. 1988. Contribución al conocimiento de Cestoda parásitos de aves del Archipiélago Canario. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, 366 pp
- Castillo A, López Román. 1989. Aportación al catálogo de Cestoda de aves de Canarias. *Revista Ibérica de Parasitología* 49: 43-44.
- Chinen AA, Suzuki H, Aplin KP, Tsuchiya K, Suzuki S. 2005. Preliminary genetic characterization of two lineages of black rats (*Rattus rattus* sensu lato) in Japan, with evidence for introgression at several localities. *Genes and Genetic Systems* 80: 367-375.
- Cordero del Campillo M, Castañón Ordóñez L, Reguera Feo A. 1994. *Índice-Catálogo de zooparásitos ibéricos*. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones, 650 pp.
- Cross JH, Chen ER. 2007. Angiostrongyliasis. In: *Food borne parasitic zoonoses*. Eds. Murrel K.D, Fried B. Springer, New York, 263-290.
- Czaplinski B, Vaucher C. 1994. Family Hymenolepididae Ariola, 1899. In: *Keys to the Cestode parasites of vertebrates*. Eds. Khalil LF, Jones A, Bray RA. Cambridge: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 595-663.
- de Bellocq JG, Sarà M, Casanova JC, Feliu C, Morand S. 2003. A comparison of the structure of helminth communities in the woodmouse, *Apodemus sylvaticus*, on islands of the western Mediterranean and continental Europe. *Parasitology Research* 90(1): 64-70.
- Drake DR, Hunt TL. 2009. Invasive rodents on islands: integrating historical and contemporary ecology. *Biological Invasions* 11: 1483-1487.
- Duffy MS, Miller CL, Kinsella JM, de Lahunta A. 2004. *Parastrongylus cantonensis* in a nonhuman primate, Florida. *Emerging Infectious Diseases* 12: 2207-2210.

- Eamsobhanaa P. 2006. *The Rat Lungworm Parastrongylus (=Angiostrongylus) cantonensis: Parasitology, Immunology, Eosinophilic Meningitis, Epidemiology and Laboratory Diagnosis*. Wankaew (IQ) Book Center Co. Ltd., Bangkok, 156 pp.
- Eira C, Torres J, Vingada J, Miquel J. 2005. Concentration of some toxic elements in *Oryctolagus cuniculus* and in its intestinal cestode *Mosgovoyia ctenoides*, in Dunas de Mira (Portugal). *The Science of The Total Environment* 346: 81-86.
- Esteban JG. 1983. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos (Insectívoros y Roedores) de las islas Gimnésicas y Pitiusas (Archipiélago Balear, España). Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, 656 pp.
- Feliu C. 1980. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos ibéricos. Helmintos de Gliridae y Muridae (Rodentia). Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 556 pp.
- Feliu C, Renaud F, Catzeflis F, Hugot JP, Durand P, Morand S. 1997. A comparative analysis of parasite species richness of iberian rodents. *Parasitology* 115: 453-66.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Flores C, Maca-Meyer N, Pérez JA, González AM, Larruga JM, Cabrera VM. 2003. A predominant European ancestry of paternal lineages from Canary Islanders. *Annals of Human Genetics* 67: 138-152.
- Foronda P. 2002. Estudio faunístico y helmintológico de helmintos de aves de Canarias. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 295 pp.
- Foronda P, Abreu-Acosta N, Casanova JC, Ribas A, Valladares B. 2009. A new Anoplocephalid (Cestoda: Cyclophyllidea) from *Gallotia atlantica* (Reptilia, Lacertidae) in the Canary Islands, Spain. *Journal of Parasitology* 95: 678-680.
- Foronda P, Casanova JC, Figueruelo E, Abreu N, Feliu C. 2005. The helminth fauna of the barbary partridge *Alectoris Barbara* in Tenerife, Canary Islands. *Journal of Helminthology* 79: 133-138.

- Foronda P, del Castillo A, Piñero J, Casanova JC. 2000. Helminths and virus infections of wild rabbit in Tenerife (Canary archipel). *Abstracts. VIII European multicolloquium of Parasitology, 10-14 September 2000, Poznań, Poland. Acta Parasitologica* 45: 176.
- Foronda P, López-González M, Martín Alonso A, Fernández A, Abreu-Acosta N, Valladares B, C Feliu. 2011a. New data about the presence of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in the Canary Islands. In: *Angiostrongylus and angiostrongyliasis: advances in the disease, control, diagnosis and molecular genetics*. Ed. Eamsobhana P. Bangkok: Department of Parasitology Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University, 93-96.
- Foronda P, López-González M, Miquel J, Torres J, Segovia M, Abreu-Acosta N, Casanova JC, Valladares B, Mas-Coma S, Bargues MD, Feliu C. 2010. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). *Acta Tropica* 114: 123-127.
- Foronda P, Martín-Alonso A, del Castillo-Figueruelo B, Feliu C, Gil H, Valladares B. 2011b. Pathogenic *Leptospira* spp. in wild rodents, Canary Islands, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 17(9): 1781-1782.
- Foronda P, Valladares B, Lorenzo-Morales J, Ribas A, Feliu C, Casanova JC. 2003. Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Macaronesia. *Journal of Parasitology* 89: 952-957.
- Foronda P, Valladares B, Rivera-Medina JA, Figueruelo E, Abreu N, Casanova JC. 2004. Parasites of *Columba livia* (Aves: Columbiformes) in Tenerife (Canary Islands) and their role in the conservation biology of the Laurel pigeons. *Parasite* 11: 311-316.
- Fu YX, Li WH. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Fregel R, Gomes V, Gusmão L, González AM, Cabrera VM, Amorim A, Larruga JM. 2009. Demographic history of Canary

- Islands male gene-pool: replacement of native lineages by european. *BMC Evolutionary Biology* 9:181.
- Fuentes MV. 1992. Ecología de los helmintos parásitos de roedores en las islas Pitiusas de Ibiza y Formentera (Archipiélago Balear, España). Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 393 pp.
- Galán-Puchades MT, Feliu C, Fons R, Mas-Coma S. 1989. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de roedores de las islas d'Hyères (Francia). *I Congreso Ibérico de Parasitología*, Cáceres, 146.
- Gijón-Botella H, López Román R, Valladares B. 1982. Digenea parásitos de aves de la provincia de Granada y del Archipiélago de Canarias. *3ª Reunión Anual de la APE Madrid*, 60.
- Gijón-Botella H, López-Román R, Valladares-Hernández B. 1985. Aportación al catálogo de digenea de aves de las Islas Canarias. *Revista Ibérica de Parasitología* 45: 263-264.
- Golvan YI, Drouhet E. 1977. Técnicas en Parasitología y Micología. Ed. Jims, Barcelona, 407 pp.
- Gratz NG. 1994. Rodents as carriers of disease. In: *Rodents pest and their control*. Eds. Buckle AP, Smith RH. CAB International, Wallingford, Oxon, 85: 1108 pp.
- Hamers T, van der Berg JHJ, van Gestel CAM, van Schooten FJ, Murk AJ. 2006. Risk assesment of metals and organic pollutants for herbivorous and carnivorous small mammal food chains in a polluted floodplain (Biesbosch, The Netherlands). *Environmental Pollution* 114: 581-595.
- Henriksen SA, Pohlenz JFL. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22: 594-596.
- Hingston M, Goodman SM, Ganzhorn1 JU, Sommer S. 2005. Reconstruction of the colonization of southern Madagascar by introduced *Rattus rattus*. *Journal of Biogeography* 32: 1549-1559.
- Ibrahim MM. 2007. Prevalence and intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in freshwater snails in

- relation to some ecological and biological factors. *Parasite* 14: 61-70.
- Izquierdo I, Martín JL, Zurita N, Arechavaleta M. 2004. *Lista de especies silvestres de Canarias (Hongos, Plantas y Animales Terrestres) 2004*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias, La Laguna, 500 pp.
- Jiménez AM. 1992. Contribución al conocimiento de la parasitofauna de micromamíferos de la isla de Córcega (Francia). Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, 421 pp.
- Jiménez JF, Valladares B, Fernández-Palacios JM, de Armas F, del Castillo A. 1997. A serologic study of human toxocariasis in the Canary Islands (Spain): environmental influences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56: 113-115.
- Kim DY, Stewart TB, Bauer RW, Mitchell M. 2002. *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* now endemic in Louisiana wildlife. *Journal of Parasitology* 88: 1024-1026.
- Kliks MM, Palumbo NE. 1992. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. *Social Science and Medicine* 34: 199-212.
- Krakau M, Thielges DW, Reise K. 2006. Native parasites adopt introduced bivalves of the North Sea. *Biological Invasions* 8: 919-925.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lin W, Wang XT. 2004. Epidemiology of *Angiostrongylus cantonensis* in mainland. *Chinese Journal of Zoonoses* 20: 1004-1007.
- Lindo JF, Waugh C, Hall J, Cunningham-Myrie C, Ashley D, Eberhard ML, Sullivan JJ, Bishop HS, Robinson DG, Holtz T, Robinson RD. 2002. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerging Infectious Diseases* 8: 324-326.

- López-Darias M, Ribas A, Feliu C. 2008. Helminth parasites in native and invasive mammal populations: comparative study on the barbary ground squirrel *Atlantoxerus getulus* L. (Rodentia, Sciuridae) in Morocco and the Canary Islands. *Acta Parasitologica* 53(3): 296-301.
- Lv S, Zhou XN, Zhang Y, Liu HX, Zhu D, Yin WG, Steinmann P, Wang XH, Jia TW. 2006. The effect of temperature on the development of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) in *Pomacea canaliculata* (Lamarck 1822). *Parasitology Research* 99: 583-587.
- Lv S, Zhang Y, Steinmann P, Zhou XN. 2008. Emerging angiostrongyliasis in Mainland China. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1611-1614.
- Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, Chen Z, Wang LY, Utzinger J, Zhou XN. 2009. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3: e368.
- Martin-Alonso A, Foronda P, Quispe-Ricalde MA, Feliu C, Valladares B. 2011. Seroprevalence of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rodents from the Canary Islands. *PLoS ONE* 6(11): e27747. doi:10.1371/journal.pone.0027747.
- Martín A, Hernández MA, Lorenzo JA, Nogales M, González C. 2000. Las palomas endémicas de Canarias. Viceconsejería de Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. SEO/BirdLife. 191 pp.
- Mas-Coma S, Esteban JG. 1988. La evolución de una fauna parasitaria en islas "continentales": el caso de los helmintos de micromamíferos en las Baleares y Pitiusas. *Bulletin d'Ecologie* 19: 211-218.
- Mas-Coma S, Feliu C. 1984. Helminthfauna from small mammals (Insectivores and Rodents) on the Pityusic Islands. In: *Biogeography and Ecology of the Pityusic Islands*. Eds. H. Kuhbier, JA Alcover & C Guerau d'Arellano Tur., Dr. W Junk Publishers, The Hague: 469-525.
- Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD, Valero MA. 1987. La evolución de una fauna parasitaria en islas "continentales": el caso de los

- helminths de micromamíferos en las Gimnésicas y Pitiusas (Archipiélago Balear). In: *Mamíferos y Helminths*. Vol. homenaje al Prof. Dr. Herman Kahmann en su 81 aniversario (V. Sans-Coma, S. Mas-Coma & J. Gosálbez dir.), Ed. Ketres, Barcelona: 203-216.
- Mas-Coma S, Esteban JG, Fuentes MV, Bargues MD, Valero MA, Galan-Puchades MT. 1998. Helminth parasites of small mammals (Insectivores and Rodents) on the Pityusic island of Formentera (Balearic Archipelago). *Research and Reviews in Parasitology* 58: 125-133.
- Matisoo-Smith E, Robins J. 2009. Mitochondrial DNA evidence for the spread of Pacific rats through Oceania. *Biological Invasions* 11: 1521-1527.
- Macnish MG, Ryan UM, Behnke JM, Thompson RCA. 2003. Detection of the rodent tapeworm *Rodentolepis* (= *Hymenolepis*) *microstoma* in humans. A new zoonosis? *International Journal for Parasitology* 33: 1079-1085.
- Meyer AN, Shankster A, Langton SD, Jukes G. 1995. National commensal rodent survey 1993. *Environmental Health* 103: 127-135.
- Milazzo C, Cagnin M, di Bella C, Geraci F, Ribas A. 2010. Helminth fauna of commensal rodents, *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia, Muridae) in Sicily (Italy). *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología* 69(2): 194-198.
- Milazzo C, de Bellocq JG, Cagnin M, Casanova JC, di Bella C, Feliu C, Fons R, Morand S, Santalla F. 2003. Helminths and ectoparasites of *Rattus rattus* and *Mus musculus* from Sicily, Italy. *Comparative Parasitology* 70(2): 199-204.
- Miquel J, Casanova JC, Fons R, Feliu C, Marchand B, Torres, J, Clara JP. 1996. Helminthes parasites des Rongeurs Muridés des îles d'Hyères (Var, France): Aspects ecologiques. *Vie et Milieu* 46: 219-223.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

- Nogales M, Rodríguez-Luengo JL, Marrero P. 2006. Ecological effects and distribution of invasive non-native mammals on the Canary Islands. *Mammal Review* 36: 49-65.
- Olson PD, Yoder K, Fajardo L-G LF, Marty AM, van de Pas S, Olivier C, Relman DA. 2003. Lethal invasive cestodiasis in immunosuppressed patients. *The Journal of Infectious Diseases* 187: 1962-1966.
- Onrubia-Pintado J. 1987. Les cultures préhistoriques des Îles Canaries, état de la question. *L'Anthropologie* 91: 653-678.
- Pagès M, Corbet G, Orth A, Volobouev V, Michaux J, Catzefflis F. 2011. Morphological, chromosomal, and genic differences between sympatric *Rattus rattus* and *Rattus satarae* in South India. *Journal of Mammalogy* 92: 659-670.
- Posada D, Crandall K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818
- Raccurt CP, Blaise J, Durette-Desset MC. 2003. Presence of *Angiostrongylus cantonensis* in Haiti. *Tropical Medicine and International Health* 8: 423-426.
- Rando JC, Cabrera VM, Larruga JM, Hernández M, González AM, Pinto F, Bandelt HJ. 1999. Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Annals of Human Genetics* 63: 413-428.
- Rando JC, Alcover JA, Navarro JF, García-Talavera F, Hutterer R, Michaux J. 2008. Chronology and causes of the extinction of the Lava Mouse, *Malpaisomys insularis* (Rodentia: Muridae) from the Canary Islands. *Quaternary Research* 70: 141-148.
- Rando JC, Alcover JA, Michaux J, Hutterer R, Navarro JF. 2012. Late-Holocene asynchronous extinction of endemic mammals on the eastern Canary Islands. *The Holocene* 22: 7801-7808.
- Ritchie LS. 1948. Another sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of US Army Medical Department* 8: 326-330.
- Robins J, Hingston M, Matisoo-Smith E, Ross HA (2007) Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA.

- Molecular Ecology Notes* 7: 717-729.
- Robins J, McLenachan PA, Phillips MJ, Craig L, Ross HA, Matisoo-Smith E. 2008. Dating of divergences within the *Rattus* genus phylogeny using whole mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 460-466.
- Roca V, Martín JE, Carbonell E. 1999. Helminths parasitising endemic geckoes from Canary Islands. *Miscel.lània Zoològica* 22: 101-108.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Russell JC, Gleeson DM, Le Corre M. 2011. The origin of *Rattus rattus* on the Îles Éparses, Western Indian Ocean. *Journal of Biogeography* 38: 1834-1839.
- Sánchez-Chardi A, Penarroya-Matutano C, Oliveira CA, Nadal J. 2007. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* 70: 101-109.
- Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, von Haeseler A. 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18: 502-504.
- Senanayake SN, Pryor DS, Walker J, Konecny P. 2003. First report of human angiostrongyliasis acquired in Sydney. *Medical Journal of Australia* 179: 430-431.
- Seurat LG. 1917. Physaloptères des mammifères du Nord-Africain. *Comptes Rendues de la Société Biologique* 80: 210-218.
- Sheather AL. 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology* 36: 266-275.
- Simberloff D. 1996. Impacts of introduced species in the United States. *Consequences* 2: 13-22.
- Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ, Spratt DM. 2003. *Rats, mice and people: rodent biology and management*. ACIAR Monograph, 96, Canberra, 564 pp.
- Soulsby EJL. 1982. *Angiostrongylus cantonensis*. In: *Helminths, Arthropods and Protozoa of*

- Domestic Animals*. Ed. London, Bailliere Tindall Publishers, London, pp. 280-281.
- Strimmer K, Haeseler A. 1996. Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology Evolution* 13: 964-969.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tarachewski H. 2006. Host and parasites as aliens. *Journal of Helminthology* 80: 99-128.
- Toledo CI, de Armas F, del Castillo A, Arevalo P, Pinero JE, Valladares B. 1994. Parasite contamination of parks and gardens a public health problem. Data of the island of Tenerife. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* 68(5-6): 615-620.
- Tollenaere C, Brouat C, Duplantier J-M, Rahalison L, Rahelinirina S, Pascal M, Moné H, Mouahid G, Leirs H, Cosson JF. 2010. Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *Journal of Biogeography* 37: 398-410.
- Torres J, Lapuente J, Eira C, Nadal J. 2004. Cadmium and lead concentrations in *Gallegoides arfaai* (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) from Spain. *Parasitology Research* 94: 268-270.
- Torres J, Miquel J, Casanova JC, Ribas A, Feliu C, Morand S. 2006. Endoparasite species richness of Iberian Carnivores: influences of

- host density and range distribution. *Biodiversity and Conservation* 15: 4619-4632.
- Towns DR, Atkinson IAE, Daugherty CH. 2006. Have the harmful effects of introduced rats on islands been exaggerated? *Biological Invasions* 8: 863-891.
- Traveset A, Nogales M, Alcover JA, Delgado JD, López-Darias M, Godoy D, Igual JM, Bover P. 2009. Invasive Rodents on Islands: A review on the effects of alien rodents in the Balearic (Western Mediterranean Sea) and Canary Islands (Eastern Atlantic Ocean). *Biological Invasions* 11: 653-670.
- Valladares B, López Román R, de Armas F, Gijón H. 1982. Parasitismo intestinal humano en el Archipiélago Canario. *Revista Ibérica de Parasitología* (extra): 497-505.
- Valladares B, Gijón H, López-Román R. 1987. *Dirofilaria immitis* en la isla de Tenerife. Algunos datos de su fisiopatología. *Revista Ibérica de Parasitología* 47: 377-380.
- Viera y Clavijo J. 1772. *Historia de las Islas Canarias*. Tomo 1. Ed. Cupsa, Madrid, 382 pp.
- Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. 2008. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infectious Diseases* 8: 621-630.
- Waugh CA, Lindo JF, Foronda P, Angeles-Santana M, Lorenzo-Morales J, Robinson RD. 2006. Population distribution and zoonotic potential of gastrointestinal helminths of wild rats *Rattus rattus* and *R. norvegicus* from Jamaica. *Journal of Parasitology* 5: 1014-1018.
- Webster JP, Macdonald DW. 1995. Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology* 111: 247-255.
- Wu GH. 2006. *Angiostrongylus cantonensis*. In: *Nature-borne Diseases*. Ed. Tang JQ, Science Press, Beijing, pp. 1182-1189.
- Yiğit N, Çolak E, Sözen M. 1998. The taxonomy and karyology of *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae). *Turkish Journal of Zoology* 22: 203-212.