

CAPÍTULO 3

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE qPCR MÚLTIPLE EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Angiostrongylus vasorum*, *Angiostrongylus cantonensis* y *Angiostrongylus costaricensis*

Implementation of Real-Time Multiplex qPCR for the Detection
of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*,
Angiostrongylus costaricensis

Carlos Andrés Aranaga Arias⁶

Rubén Eduardo Varela Miranda⁶

Diana Carolina Zambrano⁷

Adriana María Correa⁶

Resumen

Este capítulo aborda la presencia de nemátodos del género *Angiostrongylus*. Estos parásitos de importancia zoonótica, se

⁶ Universidad Santiago de Cali, Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. Cali, Colombia.

⁷ Escuela Nacional del Deporte.

Cita este capítulo

Aranaga Arias, C. A., Varela Miranda, R. E., Zambrano, D. C., & Correa, A. M. (2025). Implementación de la técnica de qPCR múltiple en tiempo real para la detección de *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum* y *Angiostrongylus costaricensis*. En R. E. Varela Miranda (Ed.), *Investigación Ecoepidemiológica de la plaga caracol gigante africano (L. fulica) y su potencial impacto en la salud ambiental del Valle del Cauca* (pp. 55-75). Editorial Universidad Santiago de Cali.

detectaron mediante la técnica de PCR Múltiple en Tiempo Real (qPCR). Estos organismos infectan el sistema nervioso central, pulmones e intestinos, tienen un ciclo de vida complejo que involucra a mamíferos como huéspedes definitivos y a moluscos como huéspedes intermediarios. El Caracol Gigante Africano (*Lissachatina fulica*), ampliamente distribuido en Colombia, es un importante reservorio para especies como *A. cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. vasorum*, que afectan la salud humana y animal.

En este estudio se recolectaron caracoles en tres comunas de Cali, Colombia, y se analizó la membrana del manto en busca de nódulos indicativos de infección. Las muestras positivas fueron sometidas a qPCR múltiple, lo que permitió detectar específicamente ADN de las especies de *Angiostrongylus*. Los resultados indicaron la presencia de *A. vasorum* en un número reducido de caracoles, mientras que no se hallaron *A. cantonensis* o *A. costaricensis*.

El uso de qPCR múltiple demostró ser una herramienta sensible y específica para estudios de epidemiología ambiental, capaz de identificar infecciones en estadios larvales en caracoles. Esto contribuye al monitoreo de enfermedades zoonóticas y apoya el desarrollo de estrategias de control y prevención. Este enfoque podría replicarse en otras áreas para fortalecer la vigilancia de *Angiostrongylus* y mitigar riesgos asociados al Caracol Gigante Africano.

Conclusión: La implementación de qPCR múltiple ofrece un método eficaz para la detección de *Angiostrongylus* s.p. en ambientes naturales, facilitando la prevención de enfermedades zoonóticas y respaldando las campañas de control del caracol invasor.

Abstract

This chapter focuses on the detection of *Angiostrongylus* spp., zoonotic parasitic nematodes, using the Multiplex Real-Time PCR (qPCR) technique. These parasites, which infect the central nervous system,

lungs, and intestines, have a complex life cycle involving mammals as definitive hosts and mollusks as intermediate hosts. The Giant African Snail (*Lissachatina fulica*), widely distributed in Colombia, is an important reservoir for species such as *A. cantonensis*, *A. costaricensis*, and *A. vasorum*, which affect human and animal health.

In this study, snails were collected from three communes in Cali, Colombia, and their mantle membranes were analyzed for nodules indicative of infection. Positive samples were subjected to multiplex qPCR, allowing for the specific detection of DNA from the three *Angiostrongylus* species. The results revealed the presence of *A. vasorum* in a small number of snails, while no *A. cantonensis* or *A. costaricensis* were found.

The use of multiplex qPCR proved to be a sensitive and specific tool for environmental epidemiology studies, capable of identifying infections at larval stages in snails. This contributes to monitoring zoonotic diseases and supports the development of control and prevention strategies. This approach could be replicated in other regions to enhance the surveillance of *Angiostrongylus* and mitigate risks associated with the Giant African Snail.

Conclusion: The implementation of multiplex qPCR provides an effective method for detecting *Angiostrongylus* sp. in natural environments, facilitating the prevention of zoonotic diseases and supporting control campaigns for the invasive snail.

Introducción

Los *Angiostrongylus* constituyen un grupo diverso de nematodos ampliamente distribuidos en todo el mundo, con la capacidad de parasitar múltiples especies animales, incluidos los seres humanos. Estos parásitos pueden afectar el sistema nervioso central (SNC), los pulmones y el intestino, ocasionando enfermedades crónicas que ponen en riesgo la vida humana (da Silva et al., 2021). Los *Angiostrongylus* han sido objeto de numerosos estudios, lo que ha

permitido caracterizar sus aspectos anatómicos, comportamientos reproductivo, evolutivo y parasítico, así como los mecanismos de activación y evasión del sistema inmunológico en el huésped humano (da Silva et al., 2021).

Los nematodos del género *Angiostrongylus* presentan un ciclo de vida complejo, en el cual un mamífero actúa como huésped definitivo, mientras que diversas especies de moluscos, entre ellas el caracol africano (*Lissachatina fulica*), funcionan como huéspedes intermediarios. Entre los huéspedes definitivos se han identificado dos especies de roedores, así como también se ha reportado la presencia del parásito en mapaches, primates y zorrillos (da Silva et al., 2021; Barratt et al., 2016).

La detección de especies patógenas de *Angiostrongylus* en muestras ambientales, como caracoles, se basa en la búsqueda de nódulos y larvas encapsuladas de color café en la membrana de la cavidad paleal del caracol (Álava et al., 2022). Sin embargo, para diferenciar entre las especies de interés clínico, es necesario observar al microscopio diversas estructuras larvales que permitan su clasificación taxonómica. En este estudio, se empleó la técnica de PCR múltiple en tiempo real (qPCR Múltiple), descrita por Varela-M et al. (2018), para determinar la presencia de las tres principales especies de *Angiostrongylus* de relevancia clínica: *A. cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. vasorum*, en la membrana del manto de caracoles africanos procedentes de distintas comunas de la ciudad de Cali, como una herramienta de utilidad en la epidemiología ambiental de *Angiostrongylus*.

Características Generales del Género *Angiostrongylus*

Angiostrongylus es un género de nematodos parásitos que pertenece al filo *Nematoda* y a la familia *Angiostrongylidae*. Este grupo incluye aproximadamente 180 especies clasificadas en 45 géneros, todas con una bolsa copulatriz característica. Estos parásitos infectan a

mamíferos, y la mayoría habita en los pulmones de sus huéspedes definitivos, mientras que sus huéspedes intermediarios suelen ser gasterópodos (Wang et al., 2008).

Hasta el momento, se han descrito cerca de 20 especies de *Angiostrongylus*, las cuales pueden dividirse en dos grupos principales: las que utilizan carnívoros como hospedadores definitivos (HD) y las que parasitan roedores. En ambos casos, el ciclo biológico requiere moluscos gasterópodos (caracoles y babosas) como hospedadores intermediarios (HI), y la gama de especies de HI es sumamente amplia en comparación con otros nematodos transmitidos por moluscos (Morgan et al., 2021). Además, en el ciclo de vida de *Angiostrongylus* pueden intervenir hospedadores paraténicos, y algunos vertebrados actúan también como HI. Los animales, incluidos los humanos, pueden ser huéspedes accidentales y desarrollar angiostrongiliasis zoonótica (Wang et al., 2008).

Entre las especies de *Angiostrongylus*, solo dos afectan al ser humano: *Angiostrongylus cantonensis*, que afecta el SNC y ocasionalmente los pulmones, y *Angiostrongylus costaricensis*, que habita en las arterias mesentéricas y causa angiostrongiliasis abdominal en América Tropical. La infección en humanos se adquiere al consumir HI como caracoles y babosas, o hospedadores paraténicos (cangrejos terrestres, camarones de agua dulce, sapos o ranas), o al ingerir vegetales que contengan las larvas infectantes en tercer estadio (da Silva et al., 2021; Barratt et al., 2016; Wang et al., 2008).

Los parásitos del género *Angiostrongylus* presentan un cuerpo filamentos, no segmentado, que se adelgaza de forma gradual en los extremos. Su longitud varía entre 17 y 25 mm, con un diámetro de 0,26 a 0,36 mm. La cutícula es lisa y ligeramente engrosada en los extremos, y la extremidad cefálica es simple, con tres labios casi imperceptibles. De estos, el labio dorsal presenta dos papilas sub-mediales, mientras que cada uno de los laterales tiene una papila sub-mediana y otra

lateral. Existen además cuatro pares de papilas distribuidas de forma simétrica en cuadrantes alrededor de la cabeza. Al carecer de cápsula bucal, la boca se abre directamente en el esófago muscular (da Silva et al., 2021; Rojas et al., 2021; Rebello, 2013).

En términos de tamaño, los machos miden entre 16 y 19 mm de longitud y 0,26 mm de diámetro. Una característica anatómica distintiva en los machos es la pequeña bolsa copulatriz, orientada hacia la porción ventral y con dos lóbulos semicirculares visibles desde el exterior que se unen en la línea media (1,7,8). En las hembras, el tamaño oscila entre 21 y 25 mm de longitud y 0,30 a 0,36 mm de diámetro; su extremo posterior se asemeja a la terminación lisa de un cuerno, con un poro anal sub-terminal en la parte ventral y una abertura bulbar situada aproximadamente a 0,2 mm por delante del ano. Los huevos, de forma ovoide y alargada, tienen una cubierta hialina, miden entre 46 y 48 por 68 a 74 μm , y no están embrionados al momento de la ovoposición. Se estima que una hembra puede poner más de 15000 huevos al día (da Silva et al., 2021, Rojas et al., 2021; Rebello, 2013).

De las larvas, los estadios más relevantes son L2 y L3. Las larvas L2 poseen una cutícula a nivel del ano completamente mudada, visible sobre la vaina; en las larvas sin vaina, el cuerpo permanece íntegro y la línea esófago-intestino aún es evidente (da Silva et al., 2021; Rojas et al., 2021; Rebello, 2013). Al acercarse al estadio L3, las larvas L2 presentan protuberancias en el extremo anterior, como puntas y estructuras en forma de barras. Las larvas L3 desarrolladas tienen movimiento activo, y la línea esófago-intestino desaparece mientras la cutícula en el área anal se vuelve más evidente. Estas larvas L2 se alojan en la membrana del manto o cavidad pulmonar del caracol, formando nódulos adheridos al tejido (da Silva et al., 2021; Rojas et al., 2021; Rebello, 2013).

Las larvas L3 tienen dos vainas: la vaina externa, producto de la primera muda, y la interna, generada en la segunda muda.

Las larvas L3 con una sola vaina son muy flexibles, y su vaina permite un movimiento coordinado. Estas larvas L3 se desprenden espontáneamente del tejido de la membrana (da Silva et al., 2021; Rojas et al., 2021; Rebello, 2013).

Ciclo de Vida, Reproducción y Epidemiología

El ciclo de vida de los nematodos del género *Angiostrongylus* es complejo e involucra tanto un mamífero como huésped definitivo como diversas especies de moluscos que actúan como huéspedes intermediarios. En el caso de *A. cantonensis*, se ha reportado que los principales huéspedes definitivos son dos especies de roedores: la rata de alcantarilla (*Rattus norvegicus*) y la rata de techo (*Rattus rattus*). Para *A. costaricensis*, se ha documentado su presencia en mapaches, primates y zorrillos (Cowie, 2013; Mota et al., 1995).

Los roedores adquieren la infección al consumir moluscos terrestres infectados, sin desarrollar enfermedad; sin embargo, otros animales, como marsupiales, aves, murciélagos, animales domésticos y primates, pueden contraer la infección y manifestar síntomas (Mendonca et al., 2002). En el caso de *A. costaricensis*, el principal huésped definitivo es el *Sigmodon hispidus* o “ratón de algodón”, presente en Centroamérica, el norte de Perú, Colombia y Venezuela. Otras especies también pueden actuar como hospedadoras, entre ellas *Rattus rattus*, *Zigodontomys microtinus*, *Liomys adspersus*, *Oligoryzomys fulvescens* y *Oligoryzomys nigripes* (Mota et al., 1995; Vitta et al., 2011).

Por su parte, el principal huésped definitivo de *A. vasorum* es el perro doméstico, aunque también se ha detectado en otros cánidos, como lobos, coyotes y perros mapaches (Morchon et al., 2021; Penagos-Tabares et al., 2018).

Los moluscos gasterópodos, que actúan como huéspedes intermediarios, se infectan al ingerir larvas de primera etapa

presentes en las heces del huésped definitivo o, en algunos casos, mediante la penetración directa de estas larvas en sus tejidos blandos. En el molusco, las larvas evolucionan a la segunda etapa y luego al tercer estadio larval, que es infeccioso para el ser humano (Turck et al., 2022).

Cuando el huésped definitivo consume moluscos que contienen larvas en el tercer estadio, estas se liberan en el estómago y migran a través del intestino, donde atraviesan la lámina basal del tejido epitelial y alcanzan el torrente sanguíneo, que las transporta hacia los pulmones y riñones. Las larvas de tercer estadio pueden llegar de manera pasiva al cerebro, un órgano inmunoprivilegiado, lo que permite su maduración al cuarto estadio (da Silva et al., 2021, Rojas et al., 2021; Rebello, 2013).

Tras completar la muda en las cavidades del sistema nervioso central, los nematodos adultos retornan al torrente sanguíneo, donde ocurre la maduración sexual y el apareamiento. En esta etapa, las hembras producen huevos que son liberados en el sistema circulatorio y se alojan en los capilares de los pulmones. Allí, los huevos eclosionan y las larvas de primera etapa migran al tracto respiratorio, ascienden por la tráquea y son deglutidas, siendo finalmente expulsadas en las heces del huésped, lo que da continuidad al ciclo tras un periodo de 40 a 50 días (da Silva et al., 2021).

La infección en humanos ocurre cuando se ingieren larvas de tercer estadio, ya sea al consumir caracoles o babosas infectados crudos o poco cocidos, o mediante la ingestión de hospedadores paraténicos o de transporte como camarones de agua dulce, ranas, lagartos monitores y planarias, o vegetales crudos contaminados con larvas o secreciones de estos huéspedes. Los humanos actúan como huéspedes accidentales o “callejones sin salida” para *A. cantonensis* y *A. costaricensis*, ya que, aunque pueden desarrollar síntomas asociados a la enfermedad, el parásito no logra completar su ciclo ni

diseminarse (da Silva et al., 2021; Wang et al., 2008; Rojas et al., 2021; Rebello, 2013).

El ciclo de vida de *A. costaricensis* es similar, con la diferencia de que los gusanos adultos se alojan en las arteriolas de la región ileocecal del huésped definitivo. En humanos, *A. costaricensis* a menudo alcanza la madurez sexual y deposita huevos en los tejidos intestinales, donde estos degeneran sin ser eliminados en las heces, causando intensas reacciones inflamatorias (da Silva et al., 2021; Icani et al., 2007).

En los últimos años, se ha ampliado considerablemente el conocimiento sobre la distribución geográfica, la prevalencia en huéspedes intermediarios y las tendencias de Angiostrongiliasis en diversas regiones del mundo. Actualmente, se sabe que *A. cantonensis* puede infectar una gran variedad de gasterópodos, y es probable que esta lista continúe creciendo con futuras investigaciones en distintas áreas geográficas.

Importancia Clínica

El perfil de las enfermedades causadas por *Angiostrongylus* s.p. varía según la especie. En el caso de la infección humana por *A. cantonensis*, este nematodo queda atrapado en el sistema nervioso central (SNC) debido a una intensa reacción inflamatoria que produce un infiltrado eosinofílico. Esto provoca la muerte de las larvas y desencadena una mayor inflamación, lo que resulta en angiostrongiliasis neural o cerebral, manifestándose como meningitis eosinofílica, encefalitis o meningoencefalitis eosinofílicas, dependiendo del área afectada (da Silva et al., 2021; Carvalho et al., 2022).

En las etapas iniciales, la enfermedad suele ser aguda y asintomática, y los síntomas, si aparecen, suelen resolverse espontáneamente en pocas semanas. Sin embargo, en algunos casos, pueden dejar secuelas graves o incluso ser mortales. Los síntomas principales incluyen cefalea y rigidez cervical, aunque a menudo pasan desapercibidos

debido a la rutina diaria y a picos febriles variables (Pai et al., 2022; Prasidthrathsint et al., 2017).

También pueden presentarse síntomas como visión borrosa, náuseas, vómitos, debilidad muscular, dolor retro orbitario, ataxia, dolor abdominal, malestar general, convulsiones, parálisis facial, somnolencia, retención e incontinencia urinaria. En caso de infección ocular, esta puede causar lesiones permanentes que resulten en una disminución o pérdida total de la visión (Gonzáles et al., 2022).

La fisiopatología de la angiostrongiliasis neural se atribuye principalmente al movimiento de las larvas, el cual implica la acción de enzimas proteolíticas y agentes proinflamatorios y citotóxicos liberados por los eosinófilos. Estos elementos agravan el daño al tejido cerebral junto con la insuficiencia vascular causada por la inflamación, lo que puede llevar a daños neurológicos permanentes (Lv S et al., 2020; Eamsobhana, 2014).

En humanos también puede desarrollarse Angiostrongiliasis abdominal, caracterizada por lesiones granulomatosas eosinofílicas en la región ileocecal, asociadas a una fuerte reacción inflamatoria por la presencia de huevos y adultos de *A. costaricensis* en las arterias mesentéricas. Los hallazgos histopatológicos incluyen vasculitis eosinofílica, apendicitis aguda, infarto intestinal y formación de pseudotumores (Solano et al., 2021; Mesén-Ramírez et al., 2008).

En cuanto a la sintomatología, la Angiostrongiliasis abdominal se manifiesta principalmente con dolor abdominal, que puede variar de leve a intenso, y ser recurrente, persistiendo durante meses y, en algunos casos, requiriendo cirugía urgente. Otros síntomas son fiebre, náuseas, vómitos, anorexia, diarrea o estreñimiento, erupciones cutáneas y pérdida de peso. Los signos clínicos incluyen distensión abdominal, dolor a la palpación, resistencia muscular, irritación peritoneal y rigidez abdominal. Un hallazgo clínico relevante es la presencia de una masa tumoral palpable en el cuadrante inferior

derecho, que puede confundirse con un plastrón apendicular o un tumor maligno (Mesén-Ramírez et al., 2008).

El cuadro clínico puede confundirse ocasionalmente con larvamigrans, una enfermedad frecuente en zonas tropicales y subtropicales que se caracteriza por una marcada movilidad parasitaria en la piel y los órganos internos, especialmente si se presenta afectación hepática. Aunque raro, se ha reportado afectación de testículos, epiplón y hernias de la pared abdominal. Los estudios radiológicos muestran dificultades en el llenado intestinal, espasticidad, distensión de asas delgadas con niveles de líquido, engrosamiento de la pared intestinal, y en casos de perforación, presencia de neumoperitoneo (da Silva et al., 2021).

Prevención y Control

Debido al amplio rango de distribución global de ratas y moluscos que actúan como huéspedes de *Angiostrongylus* s.p., su erradicación en el ambiente no es una opción viable. Sin embargo, es fundamental implementar estrategias de control para “bloquear” su transmisión a humanos. En China, Chen et al. (2012) describieron cómo, a través de la colaboración de diversas entidades, incluidas universidades, se definieron las siguientes estrategias de control: (i) desarrollo de un programa nacional de control; (ii) vigilancia activa de las infecciones tanto en humanos como en animales; y (iii) mejora de las herramientas de diagnóstico existentes o desarrollo de nuevas pruebas más eficientes (Chen et al., 2012).

Otra forma de reducir la transmisión de este parásito es mediante la educación de las poblaciones en riesgo, fomentando que eviten el consumo de hospedadores intermedios y paraténicos crudos o poco cocinados, así como de vegetales potencialmente contaminados. A pesar de que modificar costumbres profundamente arraigadas en regiones endémicas es un desafío, es una medida crucial. En lugares como Tailandia y China, donde el consumo de caracoles es común

y se preparan de diversas maneras, o en aquellas zonas donde las condiciones sanitarias son desfavorables y las verduras crudas se usan en la preparación de jugos, se han reportado brotes asociados a la presencia de *A. cantonensis* (Tsai et al., 2001; Tsai et al., 2001).

Por lo tanto, las medidas recomendadas incluyen: (1) educar al público sobre nemátodos del género *Angiostrongylus* y las enfermedades que causan; (2) consumir únicamente caracoles, babosas, moluscos pequeños y hospedadores paraténicos debidamente cocidos; (3) erradicar moluscos hospedadores cercanos a viviendas y huertos; y (4) evitar el consumo de vegetales que puedan estar contaminados con larvas infecciosas. Los viajeros a regiones endémicas deben estar conscientes de los riesgos asociados con el consumo de moluscos crudos o verduras de origen desconocido y adoptar precauciones, como lavarse las manos de forma frecuente, especialmente después de actividades como la jardinería (Khamsai et al., 2022; Aekphachaisawat et al., 2022).

Identificación de *Angiostrongylus* Mediante la Técnica de qPCR Múltiple en Tiempo Real

Se ha documentado que en América el Caracol Gigante Africano (CGA) actúa como hospedador de los parásitos *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. vasorum*. Dentro de este molusco, las larvas se desarrollan en sus etapas de segundo y tercer estadio, para luego abandonar el huésped invertebrado (4). En Colombia, la presencia del *L. fulica* ha sido confirmada en 27 de los 32 departamentos, siendo especialmente notable en regiones como Meta, Valle del Cauca, Putumayo y Caquetá, donde representa una amenaza ecológica crítica. La rápida expansión de esta especie en estas áreas ha motivado la implementación de campañas nacionales de erradicación.

Debido a que la infección por *Angiostrongylus* en humanos y animales puede ocurrir por la ingestión accidental de larvas de tercer estadio,

se requiere un método sensible y preciso para detectar la presencia de estos parásitos. Tal método debería ser aplicable tanto en muestras clínicas como en muestras ambientales, por ejemplo, en la membrana del manto de caracoles africanos, lo cual contribuiría a mejorar la vigilancia epidemiológica y a generar alertas tempranas.

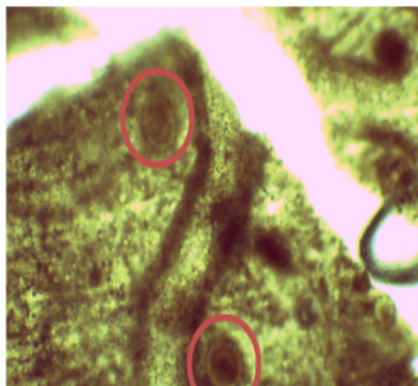
En un estudio realizado por Varela et al. (2018), se desarrolló una prueba de qPCR en tiempo real múltiple para la identificación simultánea de *A. cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. vasorum*, a partir del ADN purificado de las larvas de estas especies. Esta técnica se basó en la detección de secuencias específicas de ADN para cada especie mediante sondas marcadas con diferentes fluoróforos. El estudio detectó la presencia de *Angiostrongylus* a partir de ADN extraído directamente de la membrana del manto del *L. fulica*. Para ello, se recolectaron 369 caracoles en tres comunas de Cali entre febrero y abril de 2023 (tabla 1). Los caracoles fueron sacrificados mediante adormecimiento por frío, y luego se extrajo su manto para el análisis.

Tabla 1. Datos de colecta de los caracoles africanos

Comuna	No. de caracoles recolectados
9	44
10	222
19	103

Todos los mantos fueron observados primero al estereomicroscopio en busca de nódulos (figura 1). Se tomó una muestra de 1 cm² de los mantos, tanto de aquellos que presentaban nódulos como de los que no. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento para la extracción de ADN genómico.

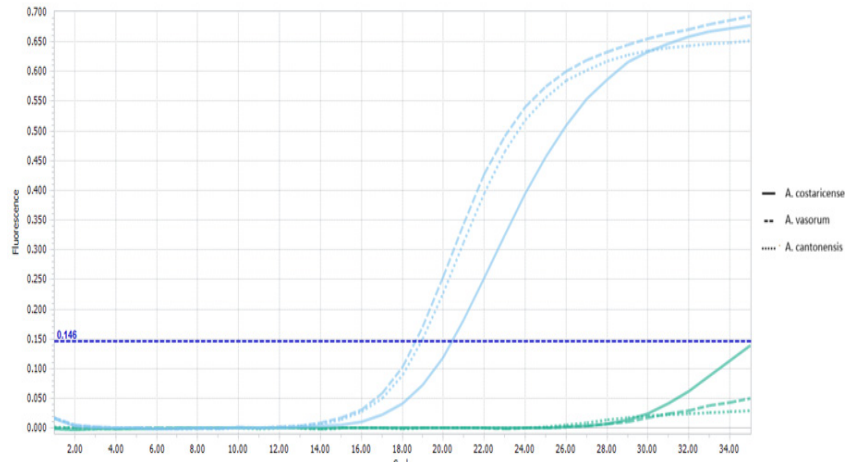
Figura 3.1. Nódulos presentes en el manto de un Caracol Africano



Para la qPCR múltiple se utilizaron los oligonucleótidos y sondas descritos por Varela et al. (2018). La mezcla de reacción se preparó con el kit comercial Luna® qPCR Master Mix (NEB), utilizando una concentración de ADN entre 10 y 40 ng/ml por reacción en un termociclador LightCycler® 96 (Roche). Como controles positivos se utilizaron ADN sintéticos que amplificaban secuencias específicas de cada especie y como control negativo, ADN del manto de un caracol no contaminado con parásitos. El perfil térmico utilizado para la amplificación se describe en la Figura 3.2.

En la Figura 3.3 se observa el resultado de la qPCR Múltiple para los controles positivos y negativo. Los valores de punto de corte obtenidos para *A. cantonensis* y *A. costaricensis* fueron 18, mientras que para *A. vasorum* fue 20, observándose un aumento progresivo de la señal fluorescente de cada uno de los controles positivos, lo que permitió distinguir que no existe interferencia con el ADN genómico del CGA.

Figura 3.3. Resultado de los controles positivos y negativos de la qPCR Múltiple para *A. cantonensis*, *A. costarricense* y *A. vasorum*



Según los resultados obtenidos por la prueba de qPCR múltiple para las muestras de mantos de los CGA recolectados en la ciudad de Cali, no se observó la presencia de las especies *A. cantonensis* y *A. costarricense* en ninguna de las tres comunas estudiadas (Tabla 2). Sin embargo, la prueba presentó positividad para *A. vasorum* en el manto de un caracol de la comuna 9, uno de la comuna 10 y cinco de la comuna 19 (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos por la técnica de qPCR Múltiple, para el ADN obtenido a partir del manto de los CGA

Comuna	No. de caracoles recolectados	No. de mantos positivos para <i>A. vasorum</i> .	No. de mantos positivos para <i>A. cantonensis</i> .	No. de mantos positivos para <i>A. costarricensis</i> .
9	44	1	0	0
10	222	1	0	0
19	103	5	0	0

Al analizar la presencia de nódulos en los mantos que fueron positivos por qPCR Múltiple, se observó que todos los mantos presentaban nódulos, lo cual es consistente con la presencia de *Angiostrongylus* en otros trabajos.

Todas las muestras positivas fueron enviadas a secuenciación, siendo consistentes con la secuencia de *A. vasorum* en todas las muestras, por lo cual no se observó la presencia de falsos positivos. A pesar de que se utilizaron diferentes concentraciones de ADN y de que el número de quistes en cada muestra era diferente, la técnica demostró tener una alta sensibilidad y selectividad para la detección del ADN del parásito. Estos resultados demuestran que la técnica de qPCR Múltiple aquí avaluada, puede ser de gran utilidad para estudios de epidemiología ambiental y como prueba diagnóstica para la detección de los tres principales parásitos *Angiostrongylus* s.p. de importancia en la salud humana y veterinaria.

Conclusiones

El estudio sobre la presencia de los parásitos *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. vasorum* en el Caracol Gigante Africano (CGA) en Colombia ha generado información relevante sobre la prevalencia y distribución de estos agentes infecciosos en poblaciones de CGA en la ciudad de Cali. El uso de la qPCR múltiple ha demostrado ser una técnica robusta, sensible y específica para la detección simultánea de estos tres parásitos en muestras ambientales, específicamente en el tejido del manto del CGA. La sensibilidad de esta técnica permite no solo detectar infecciones activas en los caracoles, sino también contribuir a la vigilancia epidemiológica mediante la identificación de caracoles infectados en regiones específicas.

Los resultados obtenidos en el análisis de los CGA en Cali indican una ausencia de *A. cantonensis* y *A. costaricensis* en las tres comunas evaluadas. Sin embargo, se detectó la presencia de *A. vasorum* en un

número limitado de caracoles de las comunas 9, 10 y 19, lo cual sugiere que esta especie puede estar presente de manera focalizada en ciertas áreas de la ciudad. La identificación de *A. vasorum* en estos caracoles es preocupante, dado su potencial para actuar como un agente zoonótico y afectar tanto a animales domésticos como a humanos. La capacidad de esta técnica para detectar infecciones en estadios larvales, sin necesidad de métodos invasivos o complejas técnicas de laboratorio, ofrece una herramienta diagnóstica que puede ser replicada en otras áreas de Colombia y América Latina, donde la propagación del CGA representa un problema de salud pública y medioambiental creciente.

Además, la presencia de nódulos en los mantos de los caracoles positivos para *A. vasorum* refuerza la asociación entre estos nódulos y la infección por *Angiostrongylus*, respaldando hallazgos de investigaciones previas. Este patrón podría servir como un indicador preliminar de infección en estudios futuros, ayudando a identificar visualmente aquellos caracoles que podrían estar infectados y facilitando la selección de muestras para análisis confirmatorios por qPCR.

Este estudio destaca la importancia de implementar métodos de diagnóstico molecular en el monitoreo ambiental para generar datos de vigilancia epidemiológica más precisos y efectivos. La qPCR múltiple no solo permite la identificación específica de las tres especies de *Angiostrongylus* relevantes para la salud humana y veterinaria, sino que también aporta un recurso valioso para campañas de control y prevención. La detección temprana de *A. vasorum* en caracoles africanos podría ayudar a alertar a las autoridades de salud y medioambiente sobre posibles focos de infección, mejorando las respuestas preventivas en comunidades vulnerables.

En conclusión, la técnica de qPCR múltiple evaluada en este estudio se consolida como una herramienta eficiente para la detección

y caracterización de infecciones por *Angiostrongylus* en CGA en ambientes naturales. Su aplicabilidad en estudios de epidemiología ambiental ofrece un método accesible y replicable que, combinado con programas de control y erradicación del CGA, podría reducir el riesgo de transmisión de estas enfermedades zoonóticas en áreas urbanas y rurales. La expansión de este tipo de metodologías a nivel nacional y en otros países de América Latina podría mejorar significativamente los esfuerzos de vigilancia y contribuir a la gestión de amenazas emergentes asociadas al CGA y a los parásitos de *Angiostrongylus*.

Referencias

- Álava, L. S., Piloza, C. B., Amador, F. S., Zerna, J. P., Guacho, C. C., Cabrera, F., et al. (2022). *Angiostrongylus cantonensis* in *Achatina fulica* in Napo province, Ecuador and the increased risk of angiostrongyliasis. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 62(3), 591–598.
- Aekphachaisawat, N., et al. (2022). A national surveillance of eosinophilic meningitis in Thailand. *Parasite Epidemiology and Control*, 19, e00272.
- Barratt, J., et al. (2016). *Angiostrongylus cantonensis*: A review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology*, 143(9), 1087–1118.
- Carvalho, M. S. N., et al. (2022). Epidemiological, clinical and laboratory aspects of *Angiostrongylus cantonensis* infection: An integrative review. *Brazilian Journal of Biology*, 82, e262109.
- Chen, J. H., et al. (2012). Frontiers of parasitology research in the People's Republic of China: Infection, diagnosis, protection and surveillance. *Parasites & Vectors*, 5(1), 221.

- Cowie, R. H. (2013). Biology, systematics, life cycle, and distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of rat lungworm disease. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health*, 72(6 Suppl 2), 6–9.
- da Silva, A. J., & Morassutti, A. L. (2021). *Angiostrongylus* spp. (Nematoda; Metastrongyloidea) of global public health importance. *Research in Veterinary Science*, 135, 397–403.
- Eamsobhana, P. (2014). Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*—A neglected disease with escalating importance. *Tropical Biomedicine*, 31(4), 569–578.
- Gonzálvez, M., & de Ybáñez, R. R. (2022). What do we know about *Angiostrongylus cantonensis* in Spain Current knowledge and future perspectives in a globalized world. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 3115–3120.
- Inceni, R. N., Caleiras, E., Martín, M., & González, C. (2007). Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: First report of a confirmed case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49(3), 197–200.
- Khamsai, S., et al. (2022). Eosinophilic meningitis epidemiological data from a national database in Thailand's Department of Disease Control: A pragmatic, retrospective analytical study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 393.
- Lv, S., Guo, Y. H., Wei, F. R., Zhang, Y., Xiao, N., & Zhou, X. N. (2020). Control of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in China. *Advances in Parasitology*, 110, 269–288.
- Mendonça, C. L. G. F., Carvalho, O. S., & Lenzi, H. L. (2002). *Angiostrongylus costaricensis* life cycle in the intermediate host *Sarasinula marginata* Semper, 1885 (Mollusca: Soleolifera). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(2), 199–200.

- Mesén-Ramírez, P., Abrahams-Sandí, E., Fernández-Quesada, K., & Morera, P. (2008). *Angiostrongylus costaricensis* egg antigen for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Journal of Helminthology*, 82(3), 251–254.
- Morgan, E. R., Modrý, D., Paredes-Esquível, C., Foronda, P., & Traversa, D. (2021). *Angiostrongylosis* in animals and humans in Europe. *Pathogens*, 10(10), 1264.
- Morchón, R., Montoya-Alonso, J. A., Sánchez-Agudo, J. Á., de Vicente-Bengochea, J., Murcia-Martínez, X., & Carretón, E. (2021). *Angiostrongylus vasorum* in domestic dogs in Castilla y León, Iberian Peninsula, Spain. *Animals*, 11(6), 1513.
- Mota, E. M., & Lenzi, H. L. (1995). *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: A new proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90(6), 707–709.
- Pai, T. Y., et al. (2022). Host transmission dynamics of first- and third-stage *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Bullastra lessoni*. *Parasitology*, 149(8), 1034–1044.
- Penagos-Tabares, F., Lange, M. K., Chaparro-Gutiérrez, J. J., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2018). *Angiostrongylus vasorum* and *Aelurostrongylus abstrusus*: Neglected and underestimated parasites in South America. *Parasites & Vectors*, 11, 208.
- Prasidthrathsint, K., Lewis, J., & Couturier, M. R. (2017). Closing the briefcase: *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis in a returned traveler. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(10), 3147–3148.
- Rebello, K. M., et al. (2013). Morphological aspects of *Angiostrongylus costaricensis* by light and scanning electron microscopy. *Acta Tropica*, 127(3), 191–198.
- Rojas, A., et al. (2021). Abdominal angiostrongyliasis in the Americas: Fifty years since the discovery of a new metastrongylid species, *Angiostrongylus costaricensis*. *Parasites & Vectors*, 14, 374.

- Solano-Barquero, A., Mora, J., Graeff-Teixeira, C., & Rojas, A. (2021). *Angiostrongylus costaricensis*. Trends in Parasitology, 37(12), 1111–1112.
- Tsai, H. C., et al. (2001). Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: Report of 17 cases. The American Journal of Medicine, 111(2), 109–114.
- Tsai, H. C., Lee, S. S. J., Huang, C. K., Yen, C. M., Chen, E. R., & Liu, Y. C. (2004). Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 71(2), 222–226.
- Turck, H. C., Fox, M. T., & Cowie, R. H. (2022). Paratenic hosts of *Angiostrongylus cantonensis* and their relation to human neuroangiostrongyliasis globally. One Health, 15, 100426.
- Varela-M., R. E., Arias, J. S., & Velásquez, L. E. (2018). Estandarización de una prueba múltiple de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la identificación de *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. vasorum*. Biomédica, 38(1), 111–119.
- Vitta, A., Polseela, R., Nateeworanart, S., & Tattiyapong, M. (2011). Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(8), 597–599.
- Wang, Q. P., Lai, D. H., Zhu, X. Q., Chen, X. G., & Lun, Z. R. (2008). Human angiostrongyliasis. The Lancet Infectious Diseases, 8(10), 621–630.