

ORIGINAL

Prevalence of Strongylida nematodes associated with African Snail, *Achatina fulica*, in Valle del Cauca, Colombia

Prevalencia de parásitos nematodos Strongylidos asociados al Caracol africano, *Achatina fulica*, en el Valle del Cauca, Colombia

Diego Córdoba-R¹ M.Sc, Angie Patiño-Montoya¹ B.Sc, Alan Giraldo^{1*} Ph.D.

¹Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Grupo de Investigación en Ecología Animal, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. *Correspondence: alan.giraldo@correounivalle.edu.co

Received: November 2016; Accepted: May 2017.

ABSTRACT

Objectives. To establish the presence and prevalence of Strongylida nematode parasites in *Achatina fulica* in the Valle del Cauca, especially of nematodes that are potentially pathogenic for humans. **Materials and methods.** *A. fulica* individuals were collected in nine cities of the Valle del Cauca, Colombia. Direct visual examination was used to identify *A. fulica* parasites. Nematodes were separated from tissue or collected from mucus, washed in saline solution, and fixed in a hot AFA solution. Samples were mounted in glycerine and observed under the microscope. **Results.** The general nematode parasite prevalence was 35% in 2013. The city with highest prevalence during 2013 was Cartago (60%), following by Buenaventura (42.9%) and Cali (33%), while during 2014 were Cali (30%) and Buenaventura (30%). The Strongylida nematodes registered were classified in three genera: *Angiostrongylus* (14.7% prevalence), *Aelurostrongylus* (2.6%), and *Strongyluris* (2.6%). The city with highest positive records of *Angiostrongylus* was Cali during 2014 and *Aelurostrongylus* was Buenaventura during 2013. *Strongyluris* genus was recorded only in Cali during 2013, with a prevalence of 11%. Of the nine evaluated cities, five has presence of *Angiostrongylus*. **Conclusions.** Three genera of Strongylida nematode were recorded associated with *A. fulica* specimens in the Valle del Cauca during 2013 and 2014. Therefore, the role that *A. fulica* and native mollusk species could be playing in the life cycle of these parasites at the local level should not underestimated.

Keywords: *Angiostrongylus*, *Achatina fulica*, Parasitology (Fuente: CAB).

RESUMEN

Objetivos. Establecer la presencia y prevalencia de parásitos nematodos Strongylida en *Achatina fulica* en el Valle del Cauca, especialmente los nematodos que son potencialmente patogénicos para los humanos. **Materiales y métodos.** Individuos de *A. fulica* fueron colectados en nueve ciudades del Valle del Cauca, Colombia. Los nematodos fueron identificados mediante inspección directa de los individuos, estos se separaron de los tejidos y el mucus, luego, los nematodos se lavaron en solución salina, y fijaron en solución AFA caliente. Se montaron placas en glicerina para observar al microscopio. **Resultados.** La prevalencia general de parásitos nematodos fue 35% en 2013. La ciudad con mayor prevalencia durante 2013 fue Cartago (60%), seguido de Buenaventura (42.9%) y Cali (33%), mientras que en 2014 fue Cali (30%) y Buenaventura (30%). Los nematodos Strongylida registrados fueron clasificados en tres géneros: *Angiostrongylus* (prevalencia 14.7%), *Aelurostrongylus* (2.6%), y *Strongyluris* (2.6%). La ciudad con la mayor cantidad de positivos para *Angiostrongylus*

fue Cali durante 2014 y Buenaventura con *Aelurostrongylus* para el 2013. El género *Strongyluris* solo se reportó en Cali durante 2013, con una prevalencia del 11%. En cinco de las nueve ciudades evaluadas se registró la presencia de *Angiostrongylus*. **Conclusiones.** Tres géneros de nematodos Strongylida se reportaron en individuos de *A. fulica* en el Valle del Cauca durante 2013 y 2014. Por lo tanto, no debe subestimarse el papel de *A. fulica* y las especies de moluscos nativas en el ciclo de vida de estos parásitos.

Palabras clave. *Angiostrongylus*, *Achatina fulica*, Parasitology (Fuente: CAB).

INTRODUCTION

The giant African snail (*Achatina fulica*) is considered one of the 100 most dangerous invasive exotic species worldwide, according to the International Union for the Conservation of Nature. This is due to the intrinsic characteristics of its natural history, such as high reproductive capacity, polyphagia, and the sympathy that it produces in humans, who have used it for several economic purposes (1). When the species began to disperse from its natural distribution range in the African continent towards other continents such as Asia, Europe, and America, it caused numerous economic losses for agriculture and commerce. It also generated great worry because of its impact on public and veterinary health in the places it colonized, because this gastropod is an intermediary host and vector of several parasite species, from protozoans to nematodes (1-3).

The nematodes of the Superfamily Metastrongyloidea, Order Strongylida, stand out among the typical parasitic load of *A. fulica*. During the adult stage these organisms are located in pulmonary arteries, in the left ventricle, in mesenteric veins, or in the pulmonary bronchia of carnivorous vertebrates (4). When they are at their first larval stage (L1) they pass through the gastrointestinal tract of the host and are expelled through feces. At this developmental stage the L1 larva uses gastropods as intermediary hosts, inside which it develops until it reaches the third stage (L3) and is ingested to go back to the vertebrate host (4-5). In other cases, paratenic hosts are also used, where the larva survives but does not develop.

Among the Strongylida nematode species that are found in *A. fulica*, the genera *Angiostrongylus* and *Aelurostrongylus*, are conspicuous because they cause diseases in animals and humans. *Angiostrongylus vasorum*, *A. cantonensis*, *A. costaricensis*, and *Aelurostrongylus abstrusus* have been the focus of attention as they can affect the health of domestic animals and human beings (4,6,7).

INTRODUCCIÓN

El caracol gigante africano (*Achatina fulica*) es considerado una de las 100 especies exóticas invasoras más peligrosas del mundo, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Esto se debe a las características intrínsecas de su historia natural, como la alta capacidad reproductiva, la polifagia y la simpatía que produce en los humanos, que la han utilizado con diversos fines económicos (1). Cuando la especie comenzó a dispersarse desde su distribución natural en el continente africano hacia otros continentes como Asia, Europa y América, provocó numerosas pérdidas económicas para la agricultura y el comercio. También generó gran preocupación debido a su impacto sobre la salud pública y veterinaria en los lugares que colonizó, debido a que este gasterópodo es un huésped intermediario y vector de varias especies de parásitos, desde protozoos hasta nematodos (1-3).

Los nematodos de la Superfamilia Metastrongyloidea, Orden Strongylida, se destacan por su carga parásita típica de *A. fulica*. Durante la etapa adulta, estos organismos se ubican en las arterias pulmonares, en el ventrículo izquierdo, en las venas mesentéricas o en los bronquios pulmonares de los vertebrados carnívoros (4). Cuando están en su primera etapa larvaria (L1) pasan a través del tracto gastrointestinal del huésped y son expulsados a través de las heces. En esta etapa de desarrollo, la larva L1 usa gasterópodos como huéspedes intermediarios, dentro de los cuales se desarrolla hasta que llega a la tercera etapa (L3) y es ingerida nuevamente por el vertebrado hospedero definitivo (4-5). En otros casos, también usan huéspedes paraténicos, donde la larva sobrevive, pero no se desarrolla.

Entre las especies de nematodos Strongylida que se encuentran en *A. fulica*, los géneros *Angiostrongylus* y *Aelurostrongylus*, son conspicuos porque causan enfermedades en animales y humanos. *Angiostrongylus vasorum*, *A. cantonensis*, *A. costaricensis* y *Aelurostrongylus abstrusus* han sido el foco de atención, ya que pueden afectar la salud de animales domésticos y seres humanos (4,6,7).

The rapid dispersal of *A. fulica* in tropical areas worldwide, added to its high potential as an intermediary host to Metastrongyloid nematodes has resulted in research on its parasitic prevalence focused on nematodes of the *Angiostrongylus* genus, of which the species *A. cantonensis* and *A. costaricensis* have caused hundreds of deaths through eosinophilic meningitis, which is endemic to Asia, and abdominal angiostrongyliasis, which is endemic to America, with the presence of *A. fulica* being associated in most cases (1,5,8). Molecular tools have recently begun to be used, such as antibodies, to diagnose diseases caused by *Angiostrongylus* (9), and morphological and molecular tools based on PCR or alternatively LAMP have been used in addition to identify helminth species (10,11).

For several years, *A. cantonensis* has been identified and associated with the African snail in several countries of Asia and Oceania. In America, this association has been demonstrated in the United States, Cuba, Jamaica, Bahamas, Puerto Rico, Dominican Republic, Haiti, Costa Rica, Brazil, Ecuador, Venezuela, and Argentina (5,12,13). Despite this, there is a lack of information on the real impact of this invasive mollusk on nematode dynamics, more so when there are no practical and effective diagnostic methods in countries where the snail plague is recent or the epidemiological and clinical impact of the nematodes, especially the genera *Angiostrongylus*, is unknown, as is the case in Colombia (5,14). Therefore, the objective of this study was to determine the presence and prevalence of Strongyloid nematodes in *Achatina fulica* of the Valle del Cauca, Colombia, mainly of those nematodes potentially pathogenic for humans.

MATERIALS AND METHODS

Study area. *Achatina fulica* individuals were collected in nine cities of the Valle del Cauca Department, in western Colombia (Figure 1). Seven cities, Jamundí (3°15'N-76°32'W), Cali (3°26'N-76°31'W), Palmira (3°31'N-76°81'W), Buga (3°54'07' N-76°18'4' W), Tuluá (4°05'N-76°12'W), Bugalagrande (4°12'N-76°18'W) and Cartago (4°44'N-75°54'W), were located along the geographic valley of the Cauca River, over a flat topography with an average elevation of 1000 m about mean sea level, 900 mm annual precipitation and average temperature of 25°C. Another city, Dagua (3°39'N-76°41'W), was located on western flat of the western Andes mountain at 1235 m about mean sea level, 1159 mm, annual precipitation and average

La rápida dispersión de *A. fulica* en áreas tropicales de todo el mundo, y su alto potencial como huésped intermediario de nematodos metastrongiloides, ha llevado a investigaciones sobre su prevalencia parasitaria centrada en los nematodos del género *Angiostrongylus*, de los cuales la especie *A. cantonensis* y *A. costaricensis* han causado cientos de muertes por meningitis eosinofílica, que es endémica de Asia, y angiostrongiliasis abdominal, que es endémica de América, con la presencia de *A. fulica* asociada en la mayoría de los casos (1,5,8). Recientemente han comenzado a utilizarse herramientas moleculares como anticuerpos, para diagnosticar enfermedades causadas por *Angiostrongylus* (9), y herramientas morfológicas y moleculares basadas en PCR o alternativamente LAMP se han utilizado para identificar especies de helmintos (10,11).

Durante varios años, *A. cantonensis* ha sido identificado y asociado con el caracol africano en varios países de Asia y Oceanía. En América, esta asociación se ha demostrado en los Estados Unidos, Cuba, Jamaica, Bahamas, Puerto Rico, República Dominicana, Haití, Costa Rica, Brasil, Ecuador, Venezuela y Argentina (5, 12, 13). A pesar de esto, hay una falta de información acerca del impacto real de este molusco invasor sobre la dinámica de los nematodos, más aún cuando no hay métodos de diagnóstico prácticos y efectivos en países donde la plaga del caracol es reciente o el impacto epidemiológico y clínico de los nematodos, especialmente el género *Angiostrongylus*, se desconoce, como es el caso en Colombia (5,14). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia y prevalencia de nematodos Strongyloidos en *Achatina fulica* en el Valle del Cauca, Colombia, principalmente de nematodos potencialmente patógenos para los humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. Individuos de *Achatina fulica* fueron recolectados en nueve ciudades del departamento del Valle del Cauca, en el oeste de Colombia (Figura 1). Se ubicaron a lo largo del valle geográfico del río Cauca, siete ciudades, Jamundí (3°15'N-76°32'W), Cali (3°26' N-76°31' W), Palmira (3°31' N-76°81' W), Buga (3°54'07" N, 76°18'4" W), Tuluá (4°05' N-76°12' W), Bugalagrande (4°12' N-76°18" W) y Cartago (4°44' N-75°54" W), sobre una topografía plana con una elevación promedio de 1000 m sobre el nivel medio del mar, 900 mm de precipitación anual y una temperatura promedio de 25°C; Dagua (3°39' N-76°41" W), ubicada en el plano occidental de la cordillera



Figura 1. Sampling sites of *Achatina fulica* in the Valle del Cauca, Colombia. Landsat image center at 3°45'2.89"N – 76°32'52.17"W. Height 350 Km. Data from: SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO. Source: Google Earth pro® 2016.

temperature of 24°C, and the last one city, Buenaventura (3°53'N -77° 05'W), the main maritime port of Colombia in the Pacific coast, was located within the biogeographic Chocó region, at 7 m about mean sea level, 7650 mm annual precipitation and annual temperature ranging between 25 and 28°C (5).

Animal collection. Taking into account the strong association of the giant African snail and the urban centers of the Valle del Cauca Department (5), the collection of individuals was focused inside the urban perimeter. Thirty cells (each of 2 km²) that encompassed the nine selected cities were defined, and three 16 m² plots were established randomly within each cell. Animals were collected by hand within each plot and kept in individual ziploc bags for transport to the laboratory.

Parasitological analysis. To obtain *A. fulica* parasites, direct visual examination of snails larger than 50 mm was carried out. Specimens larger than 50 mm have greater probability of carrying nematode larvae (7,8). Individuals were first washed externally to avoid sample contamination by soil or other waste stuck to the shell. Shell length was measured using a micrometer (0.01 mm) and were weighed using a digital scale (0.1 g). Then were extracted mechanically from the shell and dissected to obtain lung tissue. This tissue was placed in a Petri dish with water along with the remaining organs, including the foot. The lung tissue was

occidental de los Andes a 1235 m sobre el nivel medio del mar, 1159 mm, de precipitación anual y temperatura promedio de 24°C, y la última ciudad, Buenaventura (3°53'N -77°05'W), el principal puerto marítimo de Colombia en la costa del Pacífico, ubicada dentro de la región biogeográfica del Chocó, a 7 m sobre nivel medio del mar, precipitación anual de 7650 mm y temperatura anual entre 25 y 28°C (5).

Colección de animales. Teniendo en cuenta la fuerte asociación del caracol africano gigante con los centros urbanos del departamento del Valle del Cauca (5), la colección de individuos se enfocó dentro del perímetro urbano. Se definieron treinta celdas (cada una de 2 km²) que abarcaron las nueve ciudades seleccionadas, y se establecieron tres parcelas de 16 m² al azar dentro de cada celda. Los animales se recolectaron manualmente dentro de cada parcela y se guardaron en bolsas ziploc individuales para su transporte al laboratorio.

Análisis parasitológico. Para obtener parásitos de *A. fulica*, se realizó un examen visual directo de caracoles mayores de 50 mm. Los especímenes de más de 50 mm tienen una mayor probabilidad de portar larvas de nematodos (7,8). Primero se lavaron externamente para evitar la contaminación de la muestra por tierra u otros desechos pegados a la cáscara. La longitud de la concha se midió usando un micrómetro (0.01 mm) y se pesaron usando una escala digital (0.1 g). Luego se extrajeron mecánicamente de la concha y se disectaron para obtener tejido pulmonar. Este tejido se colocó en una placa de Petri con agua junto con los órganos restantes, incluido el pie. El tejido pulmonar se cortó en pedazos de 1 x 1 cm y se colocó en portaobjetos para observación bajo un estereoscopio. Los otros órganos se examinaron mediante compresión entre dos piezas de vidrio de 10 x 12 cm. Los nematodos se separaron del tejido o se recogieron del mucus. Se lavaron en solución salina y se fijaron en una solución AFA caliente, luego se montaron en un portaobjetos con glicerina de grado reactivo para limpiarlos y permitir la observación de estructuras de valor taxonómico. La identificación de nematodos para el género en la etapa de larva o quiste se basó en Thiengo (15), Ash (16), Lv et al (17), Moreira et al (8) y Rebello et al (18).

Aspectos éticos El caracol gigante africano ha sido declarado especie exótica invasora y las autoridades ambientales no requieren permisos de investigación. Se siguieron las normas de seguridad dictadas por el Ministerio de Medio Ambiente (19) para el manejo de *A. fulica* en Colombia.

cut in 1 x 1 cm pieces and placed on microscope slides for observation under a stereoscope. The other organs were examined by compression between two 10 x 12 cm glass pieces. Nematodes were separated from the tissue or collected from the mucus. They were washed in saline solution and fixed in hot AFA solution, then mounted on a slide in reactive grade glycerine to clear them and allow the observation of structures of taxonomic value. Identification of nematodes to genus at the larval or cyst stage was based on Thiengo (15), Ash (16), Lv et al (17), Moreira et al (8) and Rebello et al (18).

Ethical aspects. The giant African snail has been declared an invasive exotic species and research permits are not required by the environmental authorities. Safety regulations dictated by the Ministry of Environment (19) for handling of *A. fulica* in Colombia were followed.

Statistical analysis. Three parasitological parameters were calculated in order to evaluate the epidemiological state of the *A. fulica* population regarding Metastrongyloid nematodes of public health interest. Prevalence was calculated as the number of hosts infected by a particular parasite species divided by the number of inspected hosts expressed as a percentage. The mean abundance was calculated as the total number of individuals of a particular parasite species divided by the total number of inspected hosts. Finally, the mean intensity was calculated as the total number of individuals of a particular parasite species divided by the number of hosts infected for that parasite species (20).

Prevalence of *Angiostrongylus* in Cali and Buenaventura was compared using a Chi squared test, assuming 2013 prevalence records like expected values and 2014 prevalence records like observed data. Yates correction was used given the discrete nature of the data. In order to evaluate the tendency of parasites aggregation in the hosts, a dispersion index (ID) and Morisita Index (I_m) were calculated. Passage program V. 2.0.11.6. was used.

RESULTS

A total of 116 giant African snails were captured and checked for Strongylida parasites, ranging in length between 52 and 120 mm; 46 were captured in 2013 and 70 in 2014 (Figure 2). During 2013, 16 infected individuals were found while in 2014 only 7 infected individuals were found, with a general prevalence of 19.8% (Table 1). The cities with highest prevalence were Cartago (60% during 2013), followed by

Análisis estadístico. Se calcularon tres parámetros parasitológicos para evaluar el estado epidemiológico de la población de *A. fulica* con respecto a nematodos metastrongiloides de interés para la salud pública. La prevalencia se calculó como el número de huéspedes infectados por una especie de parásito en particular dividido por el número de huéspedes inspeccionados expresado como porcentaje. La abundancia media se calculó como el número total de individuos de una especie de parásito específico dividido por el número total de huéspedes inspeccionados. Finalmente, la intensidad media se calculó como el número total de individuos de una especie de parásito específico dividido por el número de huéspedes infectados por esa especie de parásito (20).

Se comparó la prevalencia de *Angiostrongylus* en Cali y Buenaventura usando una prueba de Chi cuadrado, asumiendo los registros de prevalencia de 2013 como los valores esperados y los registros de prevalencia de 2014 como los valores observados. Se utilizó la corrección de Yates dada la naturaleza discreta de los datos. Para evaluar la tendencia de la agregación de parásitos en los hospederos, se calcularon un índice de dispersión (ID) y un índice de Morisita (I_m). Se utilizó el programa Passage program V. 2.0.11.6.

RESULTADOS

Se capturaron y revisaron para parásitos Strongylidos en total 116 caracoles africanos, con longitud entre 52 y 120 mm; 46 fueron capturados en 2013 y 70 en 2014 (Figura 2). Durante 2013 se encontraron 16 individuos infectados mientras que en 2014 solo se encontraron 7 individuos infectados, con una prevalencia general de 19.8% (Tabla 1). Las ciudades con mayor prevalencia fueron Cartago (60% durante 2013), seguido de Buenaventura (42.9% 2013) y 30.0% durante 2014) y Cali (33.3% durante 2013 y 30.0% durante 2014) (Tabla 1).

La mayoría de las larvas se observaron nadando libremente en el mucus expulsado por los caracoles o como quistes (Figura 3). Las larvas se clasificaron en tres géneros: *Angiostrongylus* (13.8% de prevalencia), *Aelurostrongylus* (2.6%) y *Strongyluris* (2.6%) (Figura 4, Tabla 2). El género *Angiostrongylus* se registró en cinco de las nueve ciudades examinadas (Tabla 2), con la mayor prevalencia en Cartago (60.0% durante 2013), seguido de Cali y Buenaventura (30% en ambas ciudades durante 2014). Además, la ciudad con mayor registro positivo



Figure 2. Giant African snail (*Achatina fulica*) individual collected for parasitological analysis in the Valle del Cauca, Colombia.

Buenaventura (42.9% 2013 and 30.0% during 2014) and Cali (33.3% during 2013 and 30.0% during 2014). (Table 1).

Most larvae were observed swimming freely in the mucus expelled by the snails or as cysts (Figure 3). Larvae were classified in three genera: *Angiostrongylus* (13.8% prevalence), *Aelurostrongylus* (2.6%), and *Strongyluris* (2.6%) (Figure 4, Table 2). The genus *Angiostrongylus* was recorded in five of the nine examined cities (Table 2), with the highest prevalence in the Cartago (60.0% during 2013), followed by Cali and Buenaventura (30% in both cities during 2014). Furthermore, the city with highest positive records of *Aelurostrongylus* was Buenaventura (28.6% during 2013), while *Strongyluris* was only recorded in Cali during 2013 with a prevalence of 11.1% (Table 2).

A total of 1010 parasites of the genus *Angiostrongylus* were observed, including larvae and cysts of the lung tissue (Figure 3), with a general prevalence of 14.7% and mean abundance of 8.7 parasites/host. All *Angiostrongylus* individuals registered in a single individual from Jamundí were found swimming freely in the mucus of the lung cavity. In Buenaventura 7% of *Angiostrongylus* individuals were detected moving and 93% were cysts, whereas in Cali all individuals were cysts (Figure 3).

Table 1. Infection parameters of Metastrongyloid nematodes in giant African snails *A. fulica* during two seasons (2013-2014) in the Valle del Cauca, Colombia. n: specimens examined. I: specimens infected. TP: total parasites. P: prevalence. MA: mean abundance. MI: mean intensity.

Season	Location	N	I	TP	P	MA	MI
2013	Cali	27	9	32	33.3	1.2	4
	Buenaventura	7	3	10	42.9	1.43	3.33
	Cartago	5	3	26	60	5.2	8.67
	Dagua	7	1	1	14.3	0.14	1
	General	46	16	69	34.8	1.5	4.31
2014	Buenaventura	10	3	403	30.0	40.3	134.3
	Buga	10	0	0	0	0	0
	Bugalagrande	10	0	0	0	0	0
	Cali	10	3	534	30	53.4	178.0
	Jamundí	10	1	23	10	2.3	23.0
	Palmira	10	0	0	0	0	0
	Tuluá	10	0	0	0	0	0
	General	70	7	960	10.0	13.7	137.1
2013-2014	Total	116	23	1029	19.8	8.9	44.7

de *Aelurostrongylus* fue Buenaventura (28.6% durante 2013), mientras que *Strongyluris* solo se registró en Cali durante 2013 con una prevalencia de 11.1% (Tabla 2).

Se observó un total de 1.010 parásitos del género *Angiostrongylus*, incluidas larvas y quistes del tejido pulmonar (Figura 3), con una prevalencia general del 14,7% y una abundancia media de 8,7 parásitos / huésped. Todos los individuos de *Angiostrongylus* registrados en un solo individuo de Jamundí se encontraron nadando libremente en el mucus de la cavidad pulmonar. En Buenaventura, el 7% de los individuos de *Angiostrongylus* se detectaron en movimiento y el 93% fueron quistes, mientras que en Cali todos los individuos fueron quistes (Figura 3).

La prevalencia total de nematodos Strongylidos en *A. fulica* fue significativamente menor durante 2014 en comparación con 2013 ($X^2=5.81$, $p=0.01$). Sin embargo, la intensidad media fue mayor durante 2014 en comparación con 2013 (Bootstrap repeticiones 2000, $t=-4.13$, $p=0.01$), y con la excepción de Cartago, durante los dos años estudiados, los nematodos strongylidos en

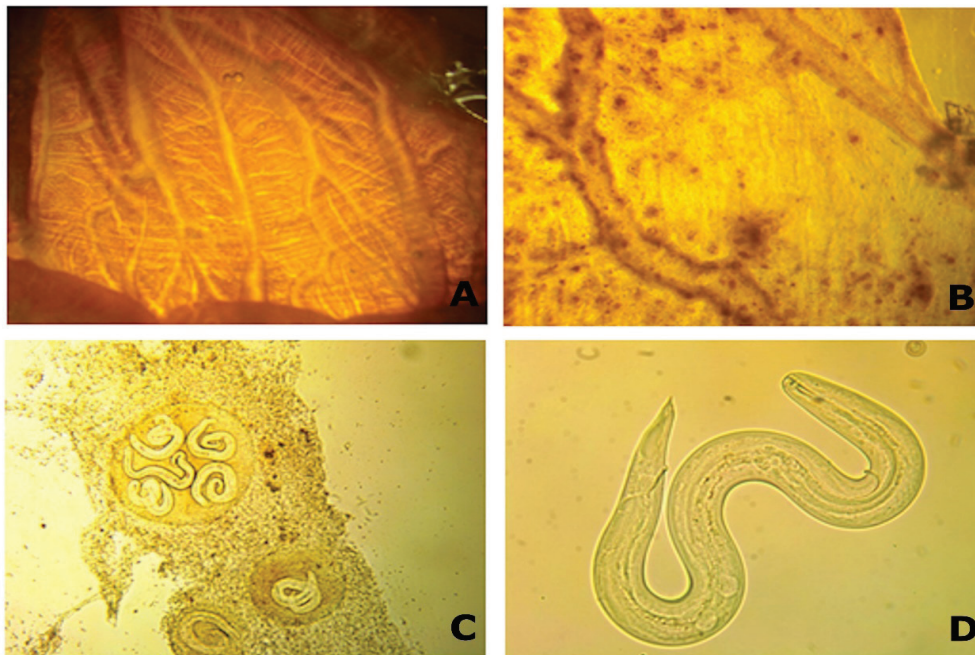


Figure 3. Results of the parasitological analyses carried out in *Achatina fulica* individuals in the Valle del Cauca, Colombia. A. Not parasitized lung tissue, B. Lung tissue infected with cysts, C. Types of cysts found, D. Nematode larvae of the *Angiostrongylus*.

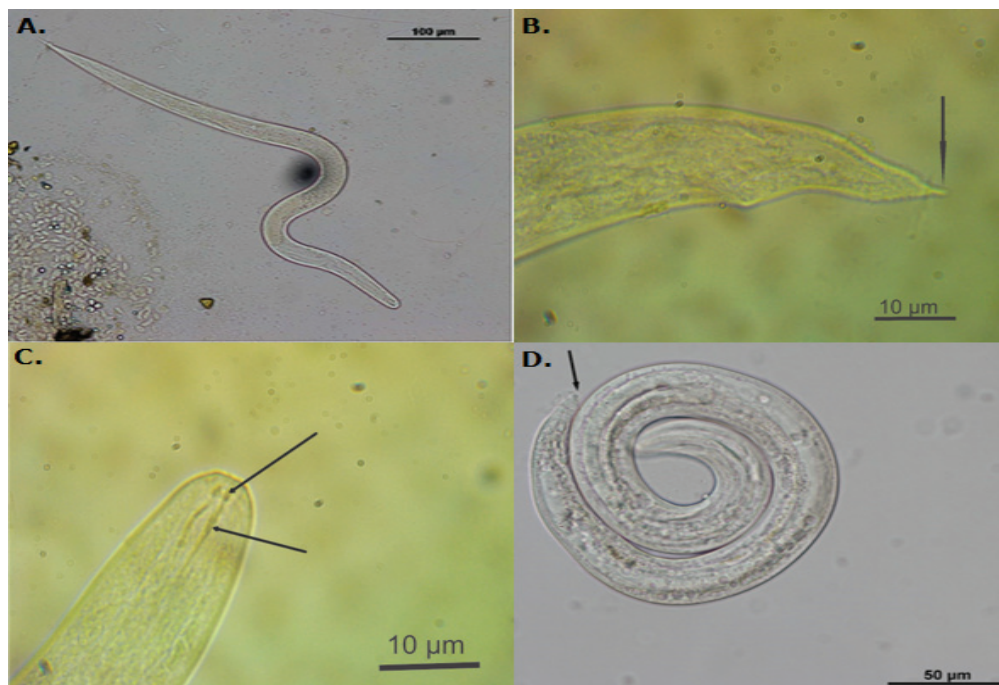


Figure 4. Larvae of Metastrongyloid nematodes recorded in the giant African snail *Achatina fulica* in the Valle del Cauca, Colombia. A. *Strongyluris*, B. Tail of *Angiostrongylus* ssp. the narrow indicates the fine termination exclusive in the genera, C. Stylet structure from *Angiostrongylus* a character reported for the metastrongyloid larva, D. *Aelurostrongylus* larva, the narrow indicate the knob ending, principal diagnostic character in L3 larval stage for *Aelurostrongylus abstrusus* (24).

Table 2. Infection parameters of Metastrongyloid nematode species in giant African snail *A. fulica* individuals from five cities of the Valle del Cauca. n: specimens examined. I: specimens infected. TP: total parasites. P: prevalence. MA: mean abundance. MI: mean intensity (MA: mean abundance. MI: mean intensity.)

Genera / Locality	n	I	TP	P	MA	MI
Angiostrongylus	116	17	1010	14.7	8.7	59.4
Cali 2013	27	5	20	18.5	0.7	4.0
Buenaventura 2013	7	1	3	14.3	0.4	3.0
Cartago 2013	5	3	26	60.0	5.2	8.7
Dagua 2013	7	1	1	14.3	0.1	1.0
Cali 2014	10	3	534	30.0	53.4	178.0
Buenaventura 2014	10	3	403	30.0	40.3	134.3
Jamundí 2014	10	1	23	10.0	2.3	23.0
Aelurostrongylus	116	3	14	2.6	0.1	4.7
Cali 2013	27	1	7	3.7	0.3	7.0
Buenaventura 2013	7	2	7	28.6	1.0	3.5
Strongyluris	116	3	5	2.6	0.1	1.7
Cali 2013	27	3	5	11.1	0.7	1.7

Total prevalence of Strongylida nematodes in *A. fulica* was significantly lower during 2014 compared with 2013 (X^2 5.81, p 0.01). However, mean intensity was higher during 2014 compared with 2013 (Bootstrap 2000 repeat, t -4.13, p 0.01), and with the exception of Cartago, during both studied years, the Strongylida nematodes in *A. fulica* exhibited an aggregated distribution in all locations (Table 3).

DISCUSSION

All Strongylida nematode associated to *A. fulica* specimens off Valle del Cauca could also use native gastropods (e.g. Veronicillidae or Strophochelidae) and vertebrates from the Orders Carnivora (especially *Canis* and *Felis*) and Rodentia (such *Rattus*) as intermediary hosts (8, 13, 19). Therefore, it is to be expected that African snails would interact with helminths present in the ecosystems they invade, although we should not rule out the possibility of introduction of parasites from the mollusk's place of origin (14).

Regarding the genera *Angiostrongylus* and *Aelurostrongylus* for which there are records of zoonosis, the established parasitological parameters were similar to those recorded in Brazil and some countries of the Asian continent, where abundant cases of *A. fulica* containing these nematode genera have been reported (8, 21).

In the Valle del Cauca, the presence of Strongylida nematode tended to be higher in the cities with influence from the Pacific region (e.g. Buenaventura, Dagua), probably due to the favorable environmental conditions that the biogeographic Chocó region

Table 3. Aggregation index for all species of nematodes associated with *Achatina fulica* 2013-2014, in localities from Valle del Cauca. DI: Dispersion Index. I_m : Morisita Index. p : p value.

Localities	Year	DI	I_m	p	Distribution
Buenaventura	2013	2.77	2.17	0.01	Aggregate
	2014	155	4.44	0	Aggregate
Cali	2013	3.57	3.15	0	Aggregate
	2014	152.14	3.56	0	Aggregate
Cartago	2013	1.42	1.33	0.22	Undefined

A. fulica mostraron una distribución agregada en todos los sitios de estudio (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Todos los nematodos Strongylidos asociados a *A. fulica* del Valle del Cauca también podrían usar gasterópodos nativos (por ejemplo, Veronicillidae o Strophochelidae) y vertebrados de las Órdenes Carnivora (especialmente *Canis* y *Felis*) y Rodentia (*Rattus*) como huéspedes intermediarios (8, 13, 19). Por lo tanto, es de esperar que los caracoles africanos interactúen con los helmintos presentes en el ecosistema que invaden, aunque no se debe descartar la posibilidad de introducción de parásitos desde el lugar de origen del molusco (14).

Con respecto a los géneros *Angiostrongylus* y *Aelurostrongylus* para los cuales existen registros de zoonosis, los parámetros parasitológicos establecidos fueron similares a los registrados en Brasil y algunos países del continente asiático, donde se han reportado abundantes casos de *A. fulica* que contienen estos nematodos (8, 21).

En el Valle del Cauca, la presencia de nematodos Strongylidos tendió a ser mayor en las ciudades con influencia de la región del Pacífico (por ejemplo, Buenaventura, Dagua), probablemente debido a las condiciones ambientales favorables que ofrece la región del Chocó biogeográfico, no solo para los hospederos sino también para los parásitos, ya que estos son sensibles a las condiciones ambientales tanto dentro como fuera de sus anfitriones (5, 21, 22). Además, el caracol africano también prefiere sitios como basureros, vertederos y lotes vacíos (15), donde existe una mayor probabilidad de contacto con ratas, necesario para que los nematodos completen su ciclo de vida. Estos sitios son comunes en las áreas estudiadas

offers, not only for hosts but also the parasites, as these are sensitive to environmental conditions both within and outside their hosts (5, 21, 22). Moreover, African snail also prefers sites such as garbage dumps, landfills and empty lots (15), where there is a higher probability of contact with rats, which are necessary for nematodes to complete their life cycle. These sites are common in the studied areas due to conditions of poverty in the human communities.

Prevalence about of 10% in the five cities where *Angiostrongylus* were detected (Cali, Jamundí, Cartago, Buenaventura, Dagua), is a clear indicator that the presence of the African snail can lead to public health problems in those locations, not only due to the high parasitic load recorded but also due the higher probability of people becoming exposed to direct contact with these animals (5, 23).

Generally, the distribution of parasites tends to be aggregated in hosts (24). In the Valle del Cauca cities, the distribution of Strongylida nematode was aggregated, with exception of Cartago, where the highest prevalence was registered. Usually, the aggregated distribution of parasites in hosts is the results of the heterogeneity in the encounters rate between susceptible and infected hosts/vectors, variations on host physiological conditions or differences in habitat quality (25). Specifically, in Strongylida nematodes it has been demonstrated that the environmental conditions that regulate the distribution of intermediate hosts, modulate the encounter probability with the final host, affecting the production of the number of eggs and L1 larvae necessary for infection (22-26).

It should be noted that other Strongylida nematode which could affect the health of domestic and wild species (4), were recorded in African snails from the Valle del Cauca. These genera, *Aelurostrongylus* and *Strongyluris*, has not been reported in other gastropods or another studies for Valle del Cauca region. In conclusion, *A. fulica* is a mollusk that can potentiate the transmission rate of Strongylida nematode to wards humans in Valle del Cauca region, due to its high reproduction rate and human-mediated dispersal capacity (1), which favor nematodes dispersal and increasing the encounter rate. Although the African snail can be an important vector of transmission of these parasites, the role that native mollusk species could be playing at the local level in the life cycle of these parasites should not be underestimated.

debido a las condiciones de pobreza en las comunidades humanas.

La prevalencia de alrededor del 10% en las cinco ciudades donde se detectó *Angiostrongylus* (Cali, Jamundí, Cartago, Buenaventura, Dagua) es un claro indicador de que la presencia del caracol africano puede provocar problemas de salud pública en esos lugares, no solo debido a la alta carga parasitaria registrada, sino también debido a una mayor probabilidad de que las personas se expongan al contacto directo con estos animales (5, 23).

En general, la distribución de parásitos tiende a agregarse en los hospederos (24). En las ciudades del Valle del Cauca, la distribución de nematodos Strongylidos fue agregada, con excepción de Cartago, donde se registró una mayor prevalencia. Por lo general, la distribución agregada de parásitos en los hospederos es el resultado de la heterogeneidad en la tasa de encuentros entre hospederos/vectores susceptibles e infectados, variaciones en las condiciones fisiológicas del huésped o diferencias en la calidad del hábitat (25). Específicamente, en los nematodos Strongylidos se ha demostrado que las condiciones ambientales que regulan la distribución de huéspedes intermediarios modulan la probabilidad de encuentros con el huésped final, afectando la producción del número de huevos y larvas L1 necesarias para la infección (22-26).

Cabe señalar que otros nematodos de Strongylida, que podrían afectar la salud de las especies domésticas y silvestres (4), se registraron en caracoles africanos del Valle del Cauca. Estos géneros, *Aelurostrongylus* y *Strongyluris*, no se han reportado en otros gasterópodos u otros estudios para la región del Valle del Cauca. En conclusión, *A. fulica* es un molusco que puede potenciar la tasa de transmisión de nematodos Strongylidos a humanos en la región del Valle del Cauca, debido a su alta tasa de reproducción y capacidad de dispersión mediada por humanos (1), que favorecen la dispersión de nematodos y aumentan la tasa de encuentro. Aunque el caracol africano puede ser un vector importante en la transmisión de estos parásitos, no debe subestimarse el papel que las especies nativas de moluscos podrían estar jugando a nivel local en el ciclo de vida de estos parásitos.

Acknowledgments

We thank to Wilmar Bolívar, Ángela María González, Mario Fernando Garcés, Angélica María Prado, Mónica Gómez, Baltazar González, Natalia Ferro, Rodrigo Lozano, Laura Obando and Natalia Rivera for their support during the field sampling. This work was co-financed by the Autonomous Regional Corporation of Valle del Cauca (CVC) and Universidad del Valle, through the project "Generation of baseline information on the invasive species *Achatina fulica* in the department of Valle del Cauca", Phase 1: Agreement 028 of 2013, Phase 2: Agreement 054 of 2014.

Agradecimientos

Agradecemos a Wilmar Bolívar, Ángela María González, Mario Fernando Garcés, Angélica María Prado, Mónica Gómez, Baltazar González, Natalia Ferro, Rodrigo Lozano, Laura Obando y Natalia Rivera por su apoyo durante el muestreo de campo. Este trabajo fue cofinanciado por la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC) y la Universidad del Valle, a través del proyecto "Generación de información de referencia sobre la especie invasora *Achatina fulica* en el departamento del Valle del Cauca", Fase 1: Acuerdo 028 de 2013, Fase 2: Acuerdo 054 de 2014.

REFERENCES

- Fontanilla IKC. *Achatina (Lissachatina) fulica* BOWDICH: Its molecular phylogeny, genetic variation in global populations, and its posible role in the spread or the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (CHEN) [Tesis doctoral]. Nottingham: Universidad de Nottingham; 2010.
- Morocoima A, Rodriguez V, Rivas R, Coriano H, Rivero S, Errante R. et al. *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda, Achatinidae) carrier of Helminthes, Protozoa and Bacteria in northeast Venezuela. *Bol Mal Salud Amb* 2014; 54(2):174-185.
- Londoño JD, Zamora A, Osorio J. *Angiostrongylus cantonensis* y el caracol gigante africano como causantes de meningitis eosinofílica. *Rev Fac Nac Salud Pública* 2013; 5(2):61-69.
- Gianelli A, Cantacessi C, Colella V, Dantas-Torres F, Otranto D. Gastropod-Borne Helminths: A look at the Snail-Parasite Interplay. *Trends in Parasitol* 2016; 32(3):255-264.
- Garcés-Restrepo MF, Patiño-Montoya A, Gómez M, Giraldo A, Bolívar-García W. Sustancias alternativas para el control del caracol africano (*Achatina fulica*) en el Valle del Cauca, Colombia. *Biota Colombiana* 2016; 17(1):44-52.
- Maldonado A, Simoes R, Thiengo S. Angiostrongyliasis in the Americas. Primera edición. Brasil: In tech; 2012.
- Archer CE, Appleton CC, Mukaratirwa S, Hope KJ. The rat lung-worm *Angiostrongylus cantonensis*: A first report in South Africa. *SAMJ*. 2011; 101(3):1-2.
- Franco-Acuña DO, Pinheiro J, Torres EJJ, Lanfredi RM, Brandolini SVPB. Nematode cyst and larvae found in *Achatina fulica* Bowdich, 1822. *J Invertebr Pathol* 2009; 100(2):106-110.
- Moreira VLC, Giese EG, Melo FTV, Simoes RO, Thiengo SC, Maldonado A. et al. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. *Acta Trop* 2013; 125(1):90-97.
- Chen D, Zhang Y, Shen H, Wei Y, Huang D, Tan Q. et al. Epidemiological survey of *Angiostrongylus cantonensis* in the west-central region of guangdong Province, China. *Parasitol Res* 2011; 109(2):305-314.
- Kim JR, Hayes KA, Yeung NW, Cowie RH. Diverse Gastropod Host of *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat lungworm, globally and with a focus on the Hawaiian Islands. *Plos One* 2014; 9(5):1-10.
- Liu C, Song H, Zhang R, Chen M, Xu M, Ai L. et al. Specific detection of *Angiostrongylus cantonensis* in the snail *Achatina fulica* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Mol Cell Probes* 2011; 25(4):164-167.
- Solorzano LF, Martini L, Hernández H, Sarracent J, Muzzio J, Rojas L. *Angiostrongylus cantonensis*: Un parásito emergente en Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2014; 66(1):20-33.

14. Charpentier L, Zumbado G, Arroyo R. Prevalencia de larvas de *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) en babosas *Vaginilus plebeius* (Mollusca: Veronicellidae) de Costa Rica. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica* 2015; 9(2):54-62.
15. Thiengo S. Presence of Strongyluris- like larvae (Nematoda) in some terrestrial mollusk in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1995; 90(5):619-620.
16. Ash L. Diagnostic Morphology of the Third-Stage Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J of Parasitol* 56(2):249-253
17. Lv S, Zhang Y, Liu H, Zhang C, Steimann P, Zhou X, Utzinger J. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Parasitol Res* 2009; 104:1351-1359
18. Rebello K, Menna-Barreto RF, Chagas-Moutinho VA, Mota EM, Perales J, Neves-Ferreira AG. et al. Morphological aspects of *Angiostrongylus costaricensis* by light and scanning electron microscopy. *Acta Trop* 2013; 127(3):191-198.
19. Resolución Número 654 de Abril 7 2011. Por el cual se corrige la Resolución No. 0848 del 23 de mayo de 2008 y se adoptan las medidas que deben seguir las autoridades ambientales, para la prevención, control y manejo de la especie Caracol Gigante Africano (*Achatina fulica*). *Diario Oficial*: n 48.041; 2011.
20. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM y Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 1997; 83(4):575-583.
21. Robles M, Kinsella JM, Galliari C, Navone GT. New host, geographic records, and histopathologic studies of *Angiostrongylus* spp (Nematoda: Angiostrongylidae) in rodents from Argentina with updated summary of records from rodent host and host specificity assessment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016; 111(3):181-191.
22. Deng ZH, Zhang QM, Huang SY, Jones JL. First provincial survey of *Angiostrongylus cantonensis* in Guangdong Province, China. *Trop Med Int Health* 2011; 17(1):119-122.
23. Tujan MA, Fontanilla IKC, Paller VGV. Vectors and spatial patterns of *Angiostrongylus cantonensis* in selected rice-farming villages of Muñoz, Nueva Ecija, Philippines. *J Parasitol Res* 2016; 2(1):1-7.
24. Morand S, Krasnov BR. Why apply ecological laws to epidemiology?. *Trends in Parasitol* 2008; 24:304-309.
25. Nouvellet P, Dumonteil E, Gourbière S. The Improbable Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Human: The Missing Link in the Dynamics and Control of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(11):1-10.
26. Dos Santos CO, Teles H, Mota EM, Lafetá C, Furtado de Mendonça GF, Lenzi HL. Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical* 2003;36(6):743-745.