

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ "**  
**CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**Tesis presentada en opción al grado científico de**  
**Doctor en Ciencias Médicas**

**Aportes al conocimiento de la angiostrongiliasis en tres cantones**  
**de Napo, República del Ecuador, 2017-2019**

**Autor: Dr. Luis Fernando Solórzano Álava, MSc.**

**La Habana, 2022**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ  
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Médicas**

**Aportes al conocimiento de la angiostrongiliasis en tres cantones  
de Napo, República del Ecuador, 2017-2019**

**Autor: Dr. Luis Fernando Solórzano Álava, MSc**

**Tutores: Lic. Hilda Hernández Álvarez, Dr. C.  
Dra. Lázara Rojas Rivera, Dr. C.**

**La Habana, 2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutoras Dra. Hilda Hernández y Dra. Lázara Rojas, mi gratitud, admiración y respeto, por su permanente guía, apoyo y preocupación.

A la Dra. Misladys Rodríguez por su asesoría en el diseño metodológico y estadístico.

Al Dr. Jorge Sarracent y al Dr. Fraga por la asesoría técnica en el trabajo de laboratorio.

A Ricardo Marcet y Mabel Figueredo, por su paciencia y apoyo en todas las prácticas de laboratorio.

A la Dra. Nereyda Cantelar por sus consejos y su amistad durante estos años.

A los colegas del Dpto. Docente y de la Comisión Científica Especializada en Parasitología por la ayuda brindada en este largo proceso.

## **DEDICATORIA**

A mis padres y a mi tía Aracely, por su guía y amor incondicional

## ABREVIATURAS

AcM: anticuerpo monoclonal

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNr: ADN ribosómico

AFLP: polimorfismo de longitud de fragmento amplificado, del inglés, *amplified fragment length polymorphism*

ARNr SSU: ARN ribosómico de la subunidad pequeña

AgES: antígeno de excreción-secreción

*Bootstrap*: término utilizado para referir el soporte de los grupos monofiléticos

CDC: Centro para el Control de Enfermedades, del inglés, *Centers for Disease Control*

*co1*: gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad 1

COIG: *co1* Guayaquil

COIN: *co1* Napo

COIO: *co1* Orellana

COIP: *co1* Pastaza

COIS: *co1* Sucumbios

COIZ: *co1* Zamora

CPP: encuesta sobre conocimientos, percepciones y prácticas

CRN Parasitología-INSP"ILIP": Centro de Referencia Nacional de Parasitología del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación Leopoldo Izquieta Pérez

*cyt B*: gen que codifica la *citocromo B*, del inglés, *cytochrome B*

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

ELISA: ensayo inmunoenzimático, del inglés, *enzyme linked immunosorbent assay*

Ig; inmunoglobulina

IL: interleucina

INSPI: Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación

IRM: imágenes de resonancia magnética

ITS: región específica de espaciadores internos de la transcripción, del inglés, *internal transcribed spacer*

L: fase larvaria o larva

LAMP: técnica de amplificación isotérmica mediada por asa, del inglés, *loop mediated isothermal amplification*

LCR: líquido cefalorraquídeo

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

MSP: Ministerio de Salud Pública

NGS: secuenciación de próxima generación, del inglés, *next generation sequencing*

Pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés, *polimerase chain reaction*

PIC: presión intracraneal

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, del inglés, *real time polimerase chain reaction*

RFLP: análisis de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción, del inglés, *restriction fragment lenght polymorphism*

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar con tecnología luminex, siglas en inglés, *random amplification polymorphic*

SNC: sistema nervioso central

Th: linfocitos T-cooperadores, del inglés, *T- helper cells*

TBE: solución amortiguadora Tris-borato EDTA

TE: solución amortiguadora Tris-EDTA

Tris base: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

US: Unidades de Salud

## SÍNTESIS

*Angiostrongylus cantonensis* se evidencia en humanos por primera vez en la República del Ecuador en 2008 y desde entonces se han notificado brotes y casos aislados. Específicamente en la provincia Napo, estudios previos mostraron una alta tasa de infección de caracoles por *A. cantonensis*. Sobre la base de estos antecedentes, se llevó a cabo una investigación con diseño mixto prospectivo, entre 2017 y 2019, que incluyó tres estudios: determinación de la prevalencia e intensidad promedio de infección por *A. cantonensis* en *Lissachatina fulica* de tres cantones de la provincia Napo (Tena, Archidona y Arosemena Tola), la realización de estudios moleculares que permitió dilucidar las relaciones filogenéticas del parásito circulante en once provincias del país y la evaluación de los conocimientos de los médicos de atención primaria sobre la angiostrongiliasis, en tres cantones de la provincia Napo, antes y después de una intervención educativa. Se demostró un alto porcentaje y elevada intensidad promedio de la infección por *A. cantonensis* de *L. fulica* en las localidades de los tres cantones de la provincia estudiada. Las secuencias nucleótidas obtenidas a partir de adultos de *A. cantonensis* de origen ecuatoriano se agruparon en un solo clado y comparten un ancestro común reciente con los haplotipos ac5 de Brasil y Japón y ac8 de Brasil. Se evidenció que médicos que prestan servicio en la atención primaria de salud mostraban marcadas deficiencias cognoscitivas, perceptuales y conductuales en relación con esta parasitosis y se comprobó el impacto positivo de una intervención educativa en la atenuación de las dificultades encontradas. Los resultados obtenidos aportan nuevas evidencias para el control integrado de esta parasitosis, lo cual contribuirá a un mejor conocimiento de esta entidad en la República del Ecuador.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| 1.1. Introducción.....   | 1  |
| 1.2. Hipótesis .....   | 4  |
| 1.3. Objetivo general .....  | 4  |
| 1.3.1. Objetivos específicos .....   | 4  |
| 1.4. Novedad Científica .....  | 4  |
| 1.5. Valor teórico - práctico.....   | 5  |
| <b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....   | 6  |
| 2.1. Clasificación y diversidad.....   | 6  |
| 2.2. Morfología e identificación .....   | 7  |
| 2.3. Ciclo de vida.....  | 9  |
| 2.4. Epidemiología de la infección por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....                | 10 |
| 2.5. Principales fuentes de infección humana.....  | 10 |
| 2.6. Factores de riesgo de la infección por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....           | 12 |
| 2.7. Hospederos definitivos .....  | 13 |
| 2.8. Situación mundial de la angiostrongiliasis .....  | 14 |
| 2.9. Situación de la angiostrongiliasis en la República del Ecuador .....                      | 17 |
| 2.10. Manifestaciones clínicas y patogenia .....   | 18 |
| 2.11.1. Métodos diagnósticos basados en morfología .....                                       | 23 |
| 2.11.2. Métodos diagnósticos basados en técnicas inmunológicas.....                            | 24 |
| 2.11.3. Métodos diagnósticos basados en la amplificación de ácidos nucleicos .....             | 27 |
| 2.12. Otras causas de etiología parasitaria que provocan meningoencefalitis eosinofílica ..... | 30 |
| 2.13. Caracterización filogénica de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....                   | 31 |
| 2.13.1. Marcadores genéticos cromosomales .....  | 31 |
| 2.13.2. Marcadores genéticos mitocondriales.....   | 32 |
| 2.13.2.1. Gen <i>citocromo oxidasa</i> subunidad 1.....  | 33 |
| 2.13.2.2. Gen de <i>citocromo B</i> .....  | 35 |
| 2.14. Prevención y tratamiento .....   | 36 |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 40 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1. Caracterización sociodemográfica del país y de las áreas de estudio seleccionadas .....   | 40        |
| 3.1.1. República del Ecuador .....   | 40        |
| 3.1.2. Provincia Napo .....  | 41        |
| 3.1.2.1. Cantón Tena.....  | 41        |
| 3.1.2.2 Cantón Archidona.....  | 42        |
| 3.1.2.3. Cantón Arosemena Tola .....   | 42        |
| 3.2. Diseño de estudio.....  | 43        |
| 3.3. Población según tipo de estudio .....   | 43        |
| 3.4. Captura y procesamiento de <i>Lissachatina fulica</i> . Obtención de las larvas.....  | 44        |
| 3.5. Estimación de la prevalencia e intensidad promedio de infección por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> en <i>Lissachatina fulica</i> .....                                | 45        |
| 3.6. Infección experimental de ratas .....   | 46        |
| 3.7. Análisis molecular y filogenético .....   | 47        |
| 3.7.1. Obtención de ADN genómico .....   | 47        |
| 3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa .....   | 47        |
| 3.7.3. Purificación de los productos de la PCR y secuenciación .....   | 48        |
| 3.7.4. Estudios de filogenia.....  | 48        |
| 3.8. Conocimientos, percepciones y práctica sobre angiostrongiliasis de médicos de atención primaria de la provincia Napo, antes y después de una intervención educativa ..... | 49        |
| 3.8.1. Universo de estudio .....   | 49        |
| 3.8.2. Criterios de inclusión y exclusión.....   | 49        |
| 3.8.3. Etapas de estudio .....   | 50        |
| 3.8.3.1. Diagnóstica.....  | 50        |
| 3.8.3.1.1. Preparación del cuestionario.....   | 50        |
| 3.8.3.1.2. Validación del cuestionario .....   | 50        |
| 3.8.3.1.3 Aplicación de la encuesta .....  | 51        |
| 3.8.3.2. Intervención para atenuar el problema.....  | 51        |
| 3.8.3.2.1. Componentes de la intervención.....   | 51        |
| 3.8.3.3. Evaluación de los conocimientos adquiridos post-intervención.....   | 51        |
| 3.9. Análisis de los resultados.....   | 52        |
| 3.10. Clasificación de variables .....   | 53        |
| 3.11. Control de sesgos.....   | 56        |
| 3.12. Aspectos éticos .....  | 57        |
| <b>IV. RESULTADOS.....</b>   | <b>58</b> |

|  |     |
|--|-----|
| 4.1. Prevalencia e intensidad de infección por <i>A. cantonensis</i> en <i>Lissachatina fulica</i> de tres cantones de Napo, República del Ecuador .....                                       | 58  |
| 4.2. Infección experimental de ratas con L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> . Análisis filogenético de parásitos adultos utilizando el gen <i>citocromo oxidasa</i> subunidad 1 .....    | 59  |
| 4.3. Conocimientos, percepciones y práctica de médicos de atención primaria sobre angiostrongiliasis de tres cantones de la provincia Napo, antes y después de una intervención educativa..... | 64  |
| 4.3.1 Evaluación de los resultados de la aplicación de la encuesta (etapa diagnóstica). .....  | 64  |
| 4.3.2. Intervención educativa.....   | 67  |
| 4.3.3. Evaluación del impacto de la intervención educativa.....  | 68  |
| 5.1. Prevalencia e intensidad promedio de infección por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> en <i>Lissachatina fulica</i> de localidades de tres cantones de Napo, República del Ecuador .....  | 76  |
| 5.2. Estudios de filogenia.....  | 78  |
| 5.3. Conocimientos sobre angiostrongiliasis de médicos de atención primaria de tres cantones de Napo, República del Ecuador, antes y después de una intervención educativa .....               | 81  |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b> .....  | 88  |
| <b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....  | 89  |
| <b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 90  |
| <b>IX. ANEXOS</b> .....  | 114 |

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Introducción

*Angiostrongylus cantonensis* se describe por primera vez en ratas en Guangzhou (Cantón), China, en 1935 (1). Este nematodo también infecta a los humanos y es la principal causa de meningoencefalitis eosinofílica, enfermedad infecciosa del Sistema Nervioso Central (SNC). La enfermedad producida por *A. cantonensis*, denominada angiostrongiliasis, se caracteriza, entre otros aspectos, por un incremento en la proporción de eosinófilos en sangre periférica y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (2).

El parásito tiene un ciclo de vida complejo. Las ratas son consideradas hospederos definitivos y diseminan la infección al medio circundante a través de las heces. El hombre, hospedero accidental, se infecta por la ingestión de larvas de tercer estadio (L3) que se encuentran en caracoles crudos o mal cocidos tales como, *Lissachatina* spp. y *Pomacea* spp. y también en babosas, que constituyen los hospederos intermediarios del parásito. Además, pueden ser vías de infección el agua dulce, ranas y peces previamente infectados (3).

La angiostrongiliasis se informa en diversas regiones del mundo, con una frecuencia cada vez mayor en China y Tailandia, por lo que se considera una enfermedad endémica en esas regiones (4). A partir de la primera notificación de infección humana por *A. cantonensis* en Taiwán en 1945 (5), se registran brotes importantes en diferentes áreas geográficas, algunas consideradas endémicas. Además, se han documentado miles de casos de angiostrongiliasis humana a nivel mundial (4), lo que constituye una amenaza no solo para las personas que viven en zonas endémicas, sino también para las que visitan estas regiones.

*Angiostrongylus cantonensis* es la causa más frecuente de meningitis eosinofílica en el sur de Asia y en algunas islas del Pacífico y del Caribe (6), con mayores registros en áreas tropicales y subtropicales del sudeste asiático y Cuenca del Pacífico (7). El

parásito es endémico, además en Australia (8), Sudeste de Estados Unidos (9), Egipto (10), Nigeria, Costa de Marfil Sudáfrica (11) y Sudamérica, Brasil (12), República del Ecuador (13), recientemente en Colombia (14) y Mallorca (15), Canarias (16) y Valencia (17) en España.

En el hemisferio occidental, la presencia del parásito se notifica, por primera vez, en Cuba en el año 1981, por lo que se fija esa fecha como el inicio de la enfermedad en esta área geográfica, aunque existen evidencias de que se encontraba en la isla desde años anteriores (18).

Este parásito atrae cada vez más la atención como consecuencia de los brotes de meningoencefalitis eosinofílica que produce, así como del número creciente de casos esporádicos, fundamentalmente viajeros que regresan a Europa procedentes de regiones endémicas (5). En muchas áreas geográficas, las poblaciones humanas invaden nuevos entornos y las condiciones socioeconómicas no permiten una atención médica adecuada, en consecuencia, muchos casos posibles de angiostrongiliasis podrían no ser notificados (19).

En Brasil en 2007, por primera vez, se identificaron en moluscos larvas de *A. cantonensis* (12). Otros estudios muestran una expansión geográfica del parásito en hospederos intermediarios y definitivos, así como de casos de la enfermedad en Norteamérica (20). Más tarde, en Guayana, se comunica un caso de meningitis eosinofílica, complicado por mielitis transversa, causada por *A. cantonensis* en un niño brasilero de 10 años que había viajado a Surinam (21).

En este sentido, es importante que el personal de salud en funciones conozca la enfermedad por lo que se hace necesario preparar programas de educación médica continua relacionados con esta parasitosis, con la finalidad de que el personal esté mejor capacitados en el abordaje integral de la enfermedad incluyendo el diagnóstico diferencial con otras parasitosis y la prevención y el control de la misma, pues el desconocimiento de estos aspectos es un problema crítico que repercute en el adecuado manejo de los pacientes (22), (23).

En la última década, se ha sustentado la importancia de la caracterización genética la cual es muy útil en la identificación de parásitos patógenos, así como para el control de la propagación de las enfermedades (24). Por su parte, el análisis filogenético es útil en la identificación del parásito y en el estudio de la evolución y distribución de *A.*

*cantonensis* basado en genes mitocondriales y ribosomales. Para el efecto se han empleado tanto marcadores nucleares como el gen de la proteína 66 kDa, las secuencias de la región específica de espaciadores internos de la transcripción, del inglés, *internal transcribed spacer* (ITS) y el gen del ARN ribosómico de la subunidad pequeña (ARNr SSU), así como mitocondriales tales como el gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad 1 (*coI*) y el gen que codifica la *citocromo B*, del inglés, *cythochrome B* (*cyt B*).

En el año 2008, este parásito se evidencia en humanos, por primera vez, en la República del Ecuador. Desde entonces, se notifican brotes de los cuales se han informado un total de 50 enfermos y casos aislados que han sido comunicados al Ministerio de Salud Pública (MSP), la mayoría con sospecha clínica-epidemiológica de la enfermedad y un caso confirmado por necropsia (13), (25).

En la República del Ecuador, en el Centro de Referencia Nacional de Parasitología del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación Leopoldo Izquieta Pérez (CRN Parasitología-INSPI “LIP”) se realizan investigaciones dirigidas principalmente al estudio de caracoles de varias regiones del país, mostrando tasas muy altas de infección por *A. cantonensis* de 27,16% (26) y 30,0% (datos INSPI no publicados, año 2016) en la provincia Napo. Sin embargo, aún se conoce poco sobre la prevalencia real de infección de *A. cantonensis* en hospederos intermediarios, no se conoce la variabilidad genética del parásito, ni sus relaciones genéticas y evolutivas, y se desconoce también sobre los conocimientos que tiene el personal médico sobre la enfermedad.

Teniendo en cuenta lo anterior, se propuso realizar la presente investigación con el propósito de estimar la prevalencia e intensidad de la infección por *A. cantonensis* de *Lissachatina fulica* en tres cantones de la provincia Napo (Tena, Archidona y Arosemena Tola) y realizar estudios moleculares que permitan dilucidar las relaciones filogenéticas del parásito circulante en once provincias del país. Además, se exploró el nivel de conocimiento de los médicos relacionados con el diagnóstico, tratamiento y control de la angiostrongiliasis en la República del Ecuador con la aplicación de una encuesta sobre conocimientos, percepciones y prácticas (CPP) con relación a esta parasitosis. Esta estuvo dirigida a profesionales de atención primaria de los tres cantones de la provincia Napo antes referidos. Con posterioridad, se realizaron un grupo de acciones tipo intervención educativa, con el propósito de atenuar las deficiencias

encontradas. Todo lo anterior podría contribuir al mejor conocimiento de esta entidad en la República del Ecuador, lo que a su vez tributaría al mejor control de la enfermedad.

## **1.2. Hipótesis**

La alta prevalencia de caracoles infectados por *A. cantonensis* y las brechas en el conocimiento de la angiostrongiliasis en los profesionales de atención primaria de salud, sumado a la ausencia de estudios genéticos del parásito, constituyen una problemática a investigar para la mejora de las competencias del personal de salud en la provincia Napo, República del Ecuador.

## **1.3. Objetivo general**

Contribuir al conocimiento de la angiostrongiliasis en tres cantones de la provincia Napo, República del Ecuador.

### **1.3.1. Objetivos específicos**

1. Estimar la prevalencia y la intensidad promedio de infección por *A. cantonensis* en *L. fulica* de tres cantones de la provincia Napo, República del Ecuador.
2. Establecer las relaciones filogenéticas entre los aislamientos del parásito de Napo, de otras provincias ecuatorianas y de otros países del mundo.
3. Evaluar los conocimientos de los médicos de atención primaria sobre la angiostrongiliasis, en tres cantones de la provincia Napo, antes y después de una intervención educativa.

## **1.4. Novedad Científica**

1. Se demostró una alta prevalencia y una elevada intensidad promedio de infección por *A. cantonensis* en *L. fulica* de tres cantones de la provincia Napo, lo que podría condicionar un alto riesgo de infección en la población.
2. El análisis filogenético, realizado por primera vez en la República del Ecuador, evidenció que los aislamientos del parásito de once regiones diferentes del país se agrupan en un mismo clado, diferente a los aislados de otras regiones del mundo. Esta ausencia de variabilidad genética entre los aislamientos

ecuatorianos podría indicar la reciente introducción del parásito en el país. Además, se determinó que las secuencias provenientes de aislamientos de origen ecuatoriano comparten un ancestro común reciente con los haplotipos ac5 Brasil y Japón y ac8 de Brasil.

3. Se evidenció que médicos que prestan servicios en la atención primaria de salud mostraban marcadas deficiencias cognitivas, perceptuales y conductuales en relación con esta parasitosis y se comprobó el efecto positivo de una intervención educativa en la atenuación de las dificultades encontradas.

### **1.5. Valor teórico - práctico**

1. El conocimiento del alto porcentaje e intensidad de infección por *A. cantonensis* de *A. fulica* en los tres cantones estudiados, teniendo en cuenta el alto riesgo de infección de la población por el consumo y manipulación de caracoles crudos, constituye una alerta a las autoridades de salud.
2. La introducción de métodos moleculares (PCR-COI y secuenciación) permitieron la caracterización molecular y el análisis filogenético de *A. cantonensis* en el laboratorio de Parasitología del INSPI de la República del Ecuador.
3. Las nuevas secuencias obtenidas y publicadas en el banco de genes constituyen herramientas de trabajo para especialistas dedicados al estudio de las relaciones filogenéticas.
4. La metodología empleada que lleva implícita el diseño y aplicación de una encuesta sobre CPP en relación a la angiostrongiliasis a profesionales de atención primaria en tres cantones de la provincia Napo, antes y después de una intervención educativa, constituye una herramienta útil que podría emplearse en el resto del país.

# **MARCO TEÓRICO**

## II. MARCO TEÓRICO

*Angiostrongylus cantonensis*, es la causa más frecuente de meningitis eosinofílica de etiología parasitaria. También puede causar encefalitis, encefalomielitis y rara vez angiostrongiliasis ocular. Más de 20 especies de *Angiostrongylus* se describen en todo el mundo (27), pero sólo *A. cantonensis* se ha confirmado que causa afectación del sistema nervioso central (SNC) en humanos (2).

### 2.1. Clasificación y diversidad

De las 20 especies del género *Angiostrongylus*, las que provocan enfermedades en los humanos son: *A. costaricensis* y *A. cantonensis*. La primera especie es causa de angiostrongiliasis abdominal. A partir de la descripción de esta especie en 1971 en Costa Rica, se ha informado también su presencia en la región del sur de los Estados Unidos y en la mayoría de los países de América Latina y varias islas del Caribe (28). En cambio, *Angiostrongylus cantonensis* es causa de meningitis eosinofílica y angiostrongiliasis ocular, y se ha extendido rápidamente en varias regiones del mundo (13).

*Angiostrongylus cantonensis* es un nematodo (phylum Nematoda) de la superfamilia *Metastrongyloidea*, familia *Angiostrongylidae* (27), que se describe por primera vez en ratas (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) en 1935 en China (1). Inicialmente, se ubicó en el género *Pulmonema*, como *Pulmonema cantonensis*; sin embargo, más tarde en 1937 se describe la misma especie como *Haemostrongylus ratti* (29). En 1946, este género comienza a nombrarse como *Angiostrongylus* y la especie como *cantonensis* (30).

En 1986, Ubelaker notifica que los nematodos estromgilidos ubicados a menudo en el género *Angiostrongylus* son heterogéneos y que las características de la bursa masculina y la identificación de los hospederos definitivos donde se localizan permiten la agrupación de este nematodo en cinco géneros distintos (31).

- *Angiostrongylus*: se encuentra en carnívoros. Ejemplo: perros, zorros, gatos.
- *Parastrongylus*: roedores. Ejemplo: ratones, ratas.
- *Angiocaulus*: mustélidos. Ejemplo: martas
- *Stefanskostrongylus*: insectívoros. Ejemplo: musarañas
- *Gallegostrongylus*: roedores. Ejemplo: jerbo

*Angiostrongylus cantonensis*, cuyo hospedero definitivo son las ratas, se transfiere al género *Parastrongylus*, convirtiéndose en *Parastrongylus cantonensis*. Esta clasificación no es adoptada en su totalidad (32), (33) y aún se conoce mayormente como *A. cantonensis*.

## 2.2. Morfología e identificación

*Angiostrongylus cantonensis* es un nematodo delgado. El adulto mide de 1,5 cm a 3 cm de longitud y se aloja en las arterias pulmonares de los hospederos definitivos. Posee una cutícula con estriaciones transversas. Los órganos sexuales de la hembra de color blanco entrecruzados con el intestino de color rojizo asemejan a un “aviso de barbería” (1), (13).

Las larvas de estadio 1 (L1) miden en promedio 0,3 mm de largo y 0,015 mm de ancho, las larvas de estadio 2 (L2) miden alrededor de 0,45 por 0,03 mm, muy similar a las L3, pero son más delgadas y para las larvas de estadio 4 (L4) se informan medidas de 1,0 por 0,4 mm. Los subadultos recién mudados llegan a 2 mm por 0,06 mm y crecen alrededor de 12 mm las hembras y 11 mm los machos antes de abandonar el cerebro de la rata. Posteriormente, migran hacia las arterias pulmonares donde maduran y alcanzan tamaño de 35 por 0,6 mm para las hembras y 25 por 0,4 mm para los machos (7) (Figura 1).

Los géneros y subgéneros pueden distinguirse en base a la apariencia de la bursa caudal que poseen los machos adultos y que utilizan durante el apareamiento con la hembra. Esta constituye una de las formas de identificación más utilizada puesto que las especies poseen pocos caracteres que permiten la diferenciación (31).

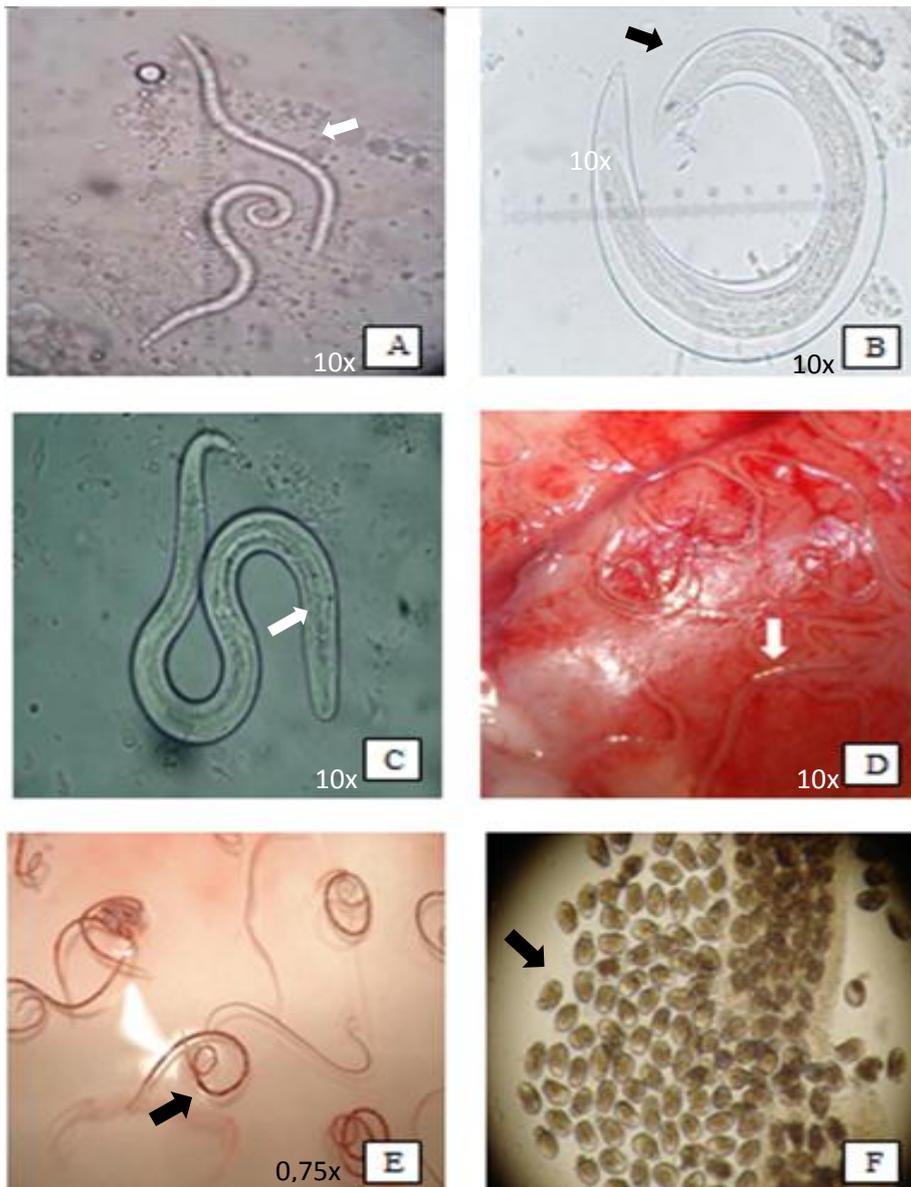


Figura 1. Diferentes etapas en el desarrollo de *Angiostrongylus cantonensis*.

A. L1, cinco días post-infección, en arteria pulmonar de rata. B. L2, noveno día post-infección en membrana paleal del caracol. C. L3, décimo quinto día post-infección en membrana paleal del caracol. D. L4/L5 de *Angiostrongylus cantonensis* en el lóbulo izquierdo del cerebro, de *Rattus norvegicus* a los 22 días post-infección. E. Adultos hembras y machos extraídos de arteria pulmonar de rata infectada en el laboratorio a los 32 días post-infección. F. Huevos (70x45 micras) de *A. cantonensis* en una arteria pulmonar de rata. La flecha indica el parásito.

Fuente: Fotos tomadas por investigadores del laboratorio de Parasitología del INSPI, periodo 2013-2019, República del Ecuador.

### 2.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de este parásito requiere de hospederos definitivos e intermediarios. Se conoce que las ratas son los hospederos definitivos de *A. cantonensis*. Después de la ingestión de las L3, estas migran al SNC donde maduran a un estado de L4, posteriormente experimentan una muda más y se convierten en L5 o gusanos jóvenes adultos. Transcurren aproximadamente 35 días desde que las L3 entran a la rata hasta que los gusanos adultos están listos para reproducirse. Cuando alcanzan la madurez sexual, ponen sus huevos en las arterias pulmonares, estos se convierten en L1 que migran al árbol bronquial y son deglutidas y excretadas en las heces (13), (34). Las heces con larvas son ingeridas por caracoles que actúan como hospederos intermediarios, progresan a la fase L3 (larva infecciosa para el hospedero definitivo y accidental) y pasan a los hospederos transportadores (paraténicos), como camarones, cangrejos de río, ranas, reptiles, cangrejos, planarias, peces, cuando estos ingieren los hospederos intermediarios infectados (35), (36), (37). Los humanos son hospederos accidentales al ingerir hospederos intermediarios o transportadores que contienen larvas infectivas. En el hombre el parásito no completa el ciclo de vida, sino que permanece en el SNC, lo que origina una meningitis eosinofílica (2) o puede instalarse en diferentes partes del ojo (cámara anterior, humor vítreo (38) y córnea (39), produciendo una angiostrongiliasis ocular (5) (Figura 2).

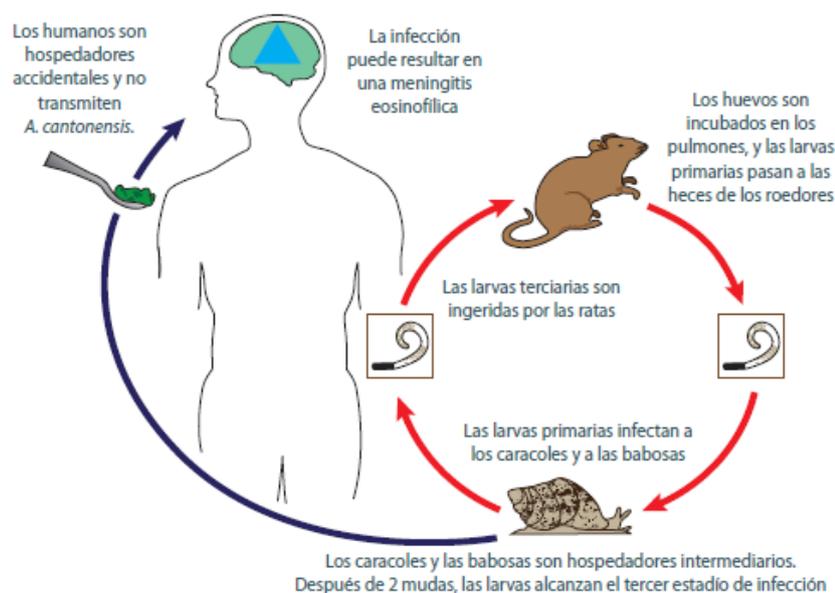


Figura 2. Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis*.

Fuente: Boletín "Enfermedades reemergentes". Perlas: Meningitis eosinofílica I: *Angiostrongylus cantonensis*, 2010: <http://www.madrid.org/cs/>

## 2.4. Epidemiología de la infección por *Angiostrongylus cantonensis*

La infección por *A. cantonensis* despierta un interés creciente en la comunidad científica producto de los brotes de meningoencefalitis eosinofílica que causa y que tienen lugar en diversos lugares del mundo, así como por la notificación de casos esporádicos en viajeros occidentales, en los últimos años. Para el año 2017, se notificaron casi un total de 3000 casos, la mayoría en el sur de China (40), pero el parásito continua propagándose por lo que actualmente presenta una distribución más amplia (41).

Se informa una alta incidencia de angiostrongiliasis humana en Tailandia y un gran número de brotes han sido informados en China continental (42). En la medida en que las áreas endémicas y los viajes internacionales se incrementan, existe una tendencia en la cual un mayor número de viajeros occidentales que retornan de áreas endémicas se notifican, a su arribo, con infección por *A. cantonensis* (5). La mayor parte de los casos se diagnostican en el sudeste de Asia y la Cuenca del Pacífico, aunque también se encuentran en Australia, algunas zonas de África, el Caribe y Estados Unidos (Florida, Texas, Louisiana y Hawaii) (40), (43), (44), (45). La epidemiología de la meningitis eosinofílica producida por *A. cantonensis* implica a humanos, vertebrados poiquiloterms y homeoterms, e invertebrados, así como a componentes ambientales; por tanto, el enfoque de "Una sola salud" es muy apropiado para buscar una comprensión holística de su transmisión y de la enfermedad. En los ecosistemas invadidos, las ratas y los caracoles son la principal fuente de datos para la cartografía de la distribución, aunque los hospedadores accidentales y paraténicos también pueden servir de centinelas para la detección de *A. cantonensis* (46).

## 2.5. Principales fuentes de infección humana

El hombre contrae la infección por el consumo de hospederos intermediarios o transportadores crudos o mal cocidos. La fuente principal varía según la ubicación geográfica y las costumbres dietéticas. Por ejemplo, en China los principales vectores son *Pomacea canaliculata* y *L. fulica* (5). Alrededor de 1800, pero principalmente desde principios y mediados del siglo XX. *L. fulica* fue introducido a los trópicos y subtrópicos y ha sido considerada la plaga más importante de caracoles en esas regiones. En Brasil, especímenes, probablemente traídos de Indonesia fueron introducidos con fines comerciales en el estado de Paraná en la década de 1980. *Lissachatina fulica* ahora está muy extendida en al menos 23 de los 26 estados

brasileños y en el Distrito Federal (47) y fue reportado por primera vez en Argentina, en la ciudad de Puerto Iguazú, provincia de Misiones, Argentina en 2010 (48).

*Pomacea canaliculata* reemplaza a *L. fulica* como el principal hospedero intermediario de infección en Taiwán y China. En Tailandia, la principal vía de infección está dada por el hábito de comer caracoles crudos o poco cocidos (49), (50). Una vía ocasional constituye el consumo de vegetales contaminados con L3, como se notifican en Jamaica y Taiwán (51), (52). Ambos actúan como hospederos intermediarios del nematodo y como vehículos de transmisión de la enfermedad a humanos (53). Sin embargo, estudios experimentales han mostrado que con *L. fulica* se alcanza mayores porcentajes de infección que con *Pomacea* spp. (54). Investigaciones en el terreno han arrojado resultados similares mostrando valores de porcentaje de infección de *L. fulica*/*P. canaliculata* de 21,6% vs 7,6% (55), 22,62 % vs 3,08% (56), 16,5% vs 5,09% (57) y 22,62% vs 12,36% (58).

En República del Ecuador, se identifican como hospederos intermediarios del parásito a caracoles dulceacuícolas *Pomacea* spp., nativos del país. También se identifican otros caracoles terrestres importados tales como *L. fulica* procedentes de África (13), (59) (Figura 3). De igual manera, se han encontrado por Martini y colaboradores en 2012, un porcentaje de infección mayor para *L. fulica* de 15,11%, 123/814, mientras que en *Pomacea* spp. han sido de 6,06%, 28/463 (60). En otro trabajo similar, también en Ecuador, Muzzio y colaboradores en el año 2014 encontraron 10,08% (481/4380) de *L. fulica* infectados versus 2,58% (57/2209) de *Pomacea* spp. (datos no publicados). La introducción de moluscos no nativos juega un rol muy importante en la transmisión de *A. cantonensis* (12). Según informes del Gobierno, estos caracoles habían sido traídos a mediados de los años 90 al país, con fines comerciales. Los criaderos de caracoles se construyeron en algunos valles de la sierra ecuatoriana, que ofrecían una temperatura ideal entre 17 °C y 25 °C (61). Sin embargo, su crianza no proporcionó los réditos económicos esperados, inevitablemente, la mayoría de los criaderos quedaron abandonados y los caracoles fueron liberados al medio ambiente. El resultado fue una infestación generalizada de áreas urbanas y rurales en casi todas las provincias del país (62). Probablemente, *L. fulica* fue el vector que introdujo al país *A. cantonensis*, al igual que sucedió en Brasil (22) y en China (63).

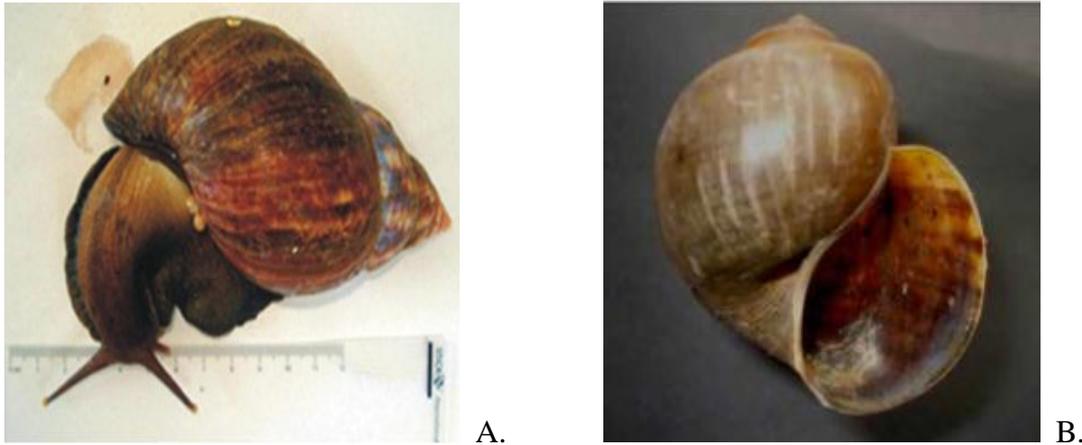


Figura 3. Principales hospederos intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis* en la República del Ecuador.

A. Caracol africano (*Lissachatina fulica*), B. *Pomacea canaliculata*

Fuente: Solórzano y colaboradores, 2014 (13) y Correoso y colaboradores, 2015 (60), respectivamente.

## 2.6. Factores de riesgo de la infección por *Angiostrongylus cantonensis*

Entre los factores de riesgo principales se destaca el consumo de caracoles y babosas crudos o poco cocidos que contienen L3 a lo que se le suma la ingestión de hospederos paraténicos también crudos o mal cocidos como el camarón de agua dulce o gambas, cangrejos y ranas (34). En individuos nativos de Australia, así como en viajeros que regresan de Jamaica, la ingestión de verduras contaminadas con L3 se considera causa de infección por *Angiostrongylus*. Por otra parte, pequeños caracoles o partes de caracoles infectados, accidentalmente ingeridos con diversos alimentos frescos constituyen otra vía de infección. De igual manera, los niños que juegan en áreas contaminadas tienen mayor riesgo de infección (51). Un brote reciente en Brasil se relaciona a prácticas religiosas, que incluye el consumo de moluscos crudos (64). Además, en la literatura científica se informa que el consumo de alimentos y agua contaminados, pueden ser vehículos de transmisión de larvas infectantes. Con el fin de limitar la aparición de posibles focos de transmisión en áreas endémicas, debe efectuarse el control y monitoreo de hospedadores intermediarios y definitivos (65). Estudios realizados en Brasil evidencian esta parasitosis como un problema de salud pública. En este sentido, es necesario que los médicos de atención conozcan adecuadamente la epidemiología y clínica de la enfermedad, para garantizar el adecuado manejo y control (65).

## 2.7. Hospederos definitivos

*Rattus norvegicus* (Figura 4), conocido como el hospedero definitivo de *A. cantonensis*, de la familia Muridae, Orden Rodentia, Clase Mammalia, Phylum Vertebrata, es un roedor omnívoro y oportunista terrestre, de color gris o marrón. Los adultos pesan entre 230-550 g con una longitud corporal de 190-265 mm y una longitud de cola de 160 a 205 mm. La forma albina se usa en los laboratorios y se crían como mascotas (66). Además de la especie mencionada, existen otros hospederos definitivos como *R. rattus*, que se presume que llegaron a la República del Ecuador en los barcos de los conquistadores españoles entre los siglos XVI o XVII (67). En 2001, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza clasifica a *R. rattus* (Figura 4), entre las 100 especies invasoras más dañinas del mundo (68). La dispersión de *A. cantonensis* en Asia meridional es probablemente consecuencia del transporte de ratas infectadas en barcos y aviones, al aumento de la migración de poblaciones humanas y a operaciones militares en las áreas endémicas, así como a la propagación de algunas especies de caracoles en diferentes partes del mundo (69).



Figura 4. Hospederos definitivos de *Angiostrongylus cantonensis*, post-mortem.

A. *Rattus rattus*, B. *Rattus norvegicus*

Fuente: Fotos tomadas del libro *Angiostrongylus cantonensis*. Emergencia en América, de Martini y Dorta, 2016. Descripción del primer foco de transmisión natural de *A. cantonensis* en Ecuador, páginas 209-220

## 2.8. Situación mundial de la angiostrongiliasis

La meningoencefalitis eosinofílica humana, causada por *A. cantonensis*, ocurre tanto en forma epidémica como esporádica en muchas áreas del Pacífico Sur, el Sudeste Asiático y Taiwán (52). A medida que se comprende mejor la epidemiología, se han informado otros casos en Australia (8), Cuba (18), República del Ecuador (70), Brasil (12), Puerto Rico (71), Madagascar (72) y África continental (73). La infección humana es rara en los Estados Unidos continentales (74).

Con la introducción del caracol nativo de Sudamérica *P. canaliculata* en Taiwán y en China en los años ochenta se produce el reemplazo de *L. fulica* como principal hospedero intermediario y se convierte en la principal fuente de infección humana en estas regiones. La ingestión de caracoles (*Pila* spp.) crudos o poco cocidos es la principal vía de infección en Tailandia, mientras en la India y Sri Lanka lo es el consumo de reptiles (75).

En 1981 Aguiar y colaboradores informan la presencia de *A. cantonensis* en Cuba, lo que constituye la primera notificación en el continente americano (18). Posteriormente, se comunica la aparición de brotes en la Ciudad de Villa Clara (76) y en varias comunidades rurales del país (77).

En Puerto Rico en 1986, se informa la presencia del parásito en *R. rattus* y *R. norvegicus*, así como, en dos especies de caracoles *Subulina octona* y *Aquebana belutin* (71). Más tarde, en 1987 en Nueva Orleans, Louisiana, se comunica la presencia de *A. cantonensis*, 20/94 (21,40%) *R. norvegicus* capturadas estaban infectadas, lo que constituye la primera notificación en América del Norte. En el mismo estudio se comprueba experimentalmente que un caracol carnívoro, *Euglandina rosea*, actúa como hospedero intermediario y paraténico. Otros gasterópodos de origen local que de forma experimental se infectan con éxito, incluyen: *Mesodon thyroidus*, *Anguispira alternata*, *Bradybaena similaris*, *S. octona*, *Polygyra triodontoides*, *Vaginulusa meghini*, *Philomycus carolinianus*, *Derocera slaeve*, *Limax flavus* y *Lehmannia poirieri* (78).

También en Miami, Florida, se informa la presencia de *A. cantonensis* en humanos, en animales de vida salvaje, domésticos y en primates no humanos (79), (44), (32), (80).

En República Dominicana en 1992, se notifica la presencia del parásito en *R. norvegicus* y en el caracol terrestre *S. octona* (81). Luego en Jamaica, 2002 en *R.*

*norvegicus* y *R. rattus*, así como en caracoles *Thelidomu asper*, *Orthalicus jamaicensi* y *Dentellaria sloaneana* (82), y en Haití en 2003, en *R. norvegicus* y *R. rattus* (83).

En Brasil en 2007, se señala a *A. cantonensis* como el agente etiológico de tres casos de meningitis eosinofílica, encontrándose también en especies de caracoles tales como, *Sarasinula marginata*, *S. octona*, *L. fulica* y *B. similares* (12). Más tarde en el año 2013, en el Amazonas brasileño se confirma la infección natural de caracoles y roedores con *A. cantonensis*. Esto fue realizado mediante análisis morfológicos y morfométricos de adultos y larvas por microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y secuencias moleculares de *co1* (84).

En el nordeste de Brasil en 2019 se notifica infección por *A. cantonensis* en tres especies de caracoles: *L. fulica*, *Bulimulus tenuissimus* y *Cyclodontina fasciata*. Estas dos últimas especies se informan por primera vez como hospederos intermediarios del parásito (85).

En las Islas Canarias, en España se comunica la presencia del parásito en el año 2010 con una prevalencia de 20,0%. Según el análisis morfológico y molecular, con secuencias ITS y un fragmento de las secuencias de nucleótidos del ARNr SSU, se confirma la presencia de *A. cantonensis* en *R. rattus* (33). En 2015 se señala el papel que desempeñan la babosa *Plutonia lamarckii* y los caracoles *Cornu aspersum* y *Theba pisana*, como hospederos intermediarios de *A. cantonensis* en Tenerife. La identificación se basó en las características morfológicas y en el análisis de los ácidos nucleicos mediante amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP, del inglés, *loop mediated isothermal amplification*) (86). En octubre de 2018, en dos erizos (*Ateleurix algirus*) provenientes de Mallorca (islas Baleares, España) se identificaron nematodos que se confirman como *A. cantonensis* con la utilización de herramientas moleculares (15).

En los Estados Unidos, región del Golfo de México en 2013, la detección de *A. cantonensis* en *P. maculata* y *L. fulica* en Louisiana y Florida respectivamente, indica que los moluscos no nativos sirven como reservorios, lo que facilita que *A. cantonensis* se expanda a otros estados (87).

En Hawaii en 2014, el cribado molecular de siete especies de gasterópodos nativas y 30 no nativas revelan la presencia del parásito en 16 especies (2 nativas, 14 no nativas). Cuatro de las especies probadas son hospederos registrados, dos especies introducidas

*Oxychilusalliarius* y *Cyclotropi* ssp.) y dos nativas (*Philonesia* sp. y *Tornatellide* ssp.) (53).

En Oklahoma (EUA) en 2015, mediante el análisis por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, del inglés, *real time polimerase chain reaction*) y la secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN), se encuentra evidencia de la presencia de *A. cantonensis* en una especie de rata denominada *Sigmodon hispidus* en la que no se había identificado previamente el parásito. Los resultados indican una expansión geográfica de este parásito de importancia médica y ecológicamente relevante en América del Norte (88).

Recientemente, en 2019, en Guadalupe, Antillas menores se notifica 32,40% de *L. fulica*, infectados por *A. cantonensis*, según la técnica de qPCR (89). Estudios previos en la isla de Granada informan 23,40% (90) y 35,20% (91) de *R. norvegicus* infectadas por este parásito.

Además, en el año 2019, se confirma la presencia de *A. cantonensis* en el tejido pulmonar de especímenes de *L. fulica*, recolectados en la Ciudad de Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia mediante análisis histológico (89,0%), reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *polimerase chain reaction*) convencional (95,0%) y qPCR (100%) (14).

En la figura 5 se muestran los principales países donde se notifican infecciones por *A. cantonensis*.



Figura 5. Distribución geográfica de angiostrongiliasis cerebral producida por *Angiostrongylus cantonensis*.

■ Países con regiones endémicas (casos humanos o reservorios animales), ● Casos esporádicos de infección humana por *A. cantonensis*, ▲ Brotes de infección humana por *A. cantonensis*, ■ Sin información o regiones no endémicas

Fuente: Mapa realizado por Zimmermann del Departamento de Microbiología Médica del Centro Médico Universitario de Amsterdam, adaptado por Wang y colaboradores (4) y Barrat y colaboradores (34).

## 2.9. Situación de la angiostrongiliasis en la República del Ecuador

En los meses de marzo y abril de 2008, se notificaron en dos hospitales de la Ciudad de Guayaquil, pacientes con manifestaciones clínicas variadas con predominio de dolor abdominal, náuseas y vómitos severos, constipación intestinal, mialgias, astenia, signos y síntomas neurológicos que incluían cefalea y alteraciones visuales. Dichos pacientes tenían el antecedente de ingestión de caracoles crudos. El seguimiento de estos casos reveló una evolución con eosinofilia tanto en sangre periférica como en LCR (13). A partir de ese momento, las autoridades locales dispusieron que el Subproceso de Parasitología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”, actualmente llamado Instituto de Investigación y Salud Pública (INSPI), iniciara una investigación epidemiológica y parasitológica en el sitio de donde provenían los

pacientes hospitalizados en provincia de Los Ríos, cantón Ventanas, recinto la Ercilia. Como resultado, se capturaron siete ratas, cuyo sistema cardiopulmonar se disectó en busca de parásitos, recuperándose gusanos adultos de la arteria pulmonar de dos ejemplares, y además, se identificaron larvas en hospederos intermediarios. Este constituyó el primer registro de *A. cantonensis* en la República del Ecuador (62). En relación a la infección en humanos, hasta el año 2009 se informan siete brotes en varias provincias del país, que afectaron a 19 adultos y 7 niños (70). Posteriormente, se realizan estudios sobre la presencia del parásito en hospederos definitivos e intermediarios en varias provincias, con la finalidad de describir la situación en relación a esta parasitosis y se encuentra que de 2013 a 2017, 77/211 (36,49%) y 441/2908 caracoles (15,16%) estaban infectados con *A. cantonensis* (26).

Según notificaciones nacionales el número de casos incrementa con el tiempo, por lo que se sugiere la implementación de métodos inmunológicos y moleculares que apoyen el diagnóstico de esta entidad (13), (92).

*Angiostrongylus cantonensis*, la causa más frecuente de meningoencefalitis eosinofílica en el hombre, constituye un problema de salud pública en la República del Ecuador. Esta parasitosis se considera emergente con aparición de brotes y casos esporádicos, algunos con desenlaces fatales (93).

## **2.10. Manifestaciones clínicas y patogenia**

Una vez que el hombre ingiere la L3, esta invade el tejido intestinal, causando una enteritis, antes de pasar por el hígado. En su paso por los pulmones, el paciente desarrolla síntomas como tos, rinorrea, dolor de garganta, además de malestar general y fiebre. El parásito tiene un especial tropismo por el SNC (94).

La encefalitis/encefalomielitis causada por *A. cantonensis* es una enfermedad grave que se caracteriza por cambios en el estado mental que incluyen coma y signos neurológicos focales. Los pacientes con frecuencia desarrollan meningitis eosinofílica y/o un síndrome de dolor abdominal transitorio que evoluciona con trastornos sensoriales y motores de las piernas, con dolor, debilidad, ausencia de reflejos, disfunción intestinal/vesical, hipertensión lábil, coma y, en casos graves puede provocar la muerte (95).

Las manifestaciones neurológicas de la infección por *A. cantonensis* incluyen además, radiculitis, anomalías de los nervios craneales y ataxia (6).

La presentación clínica clásica de la infección es una meningitis/meningoencefalitis. Los pacientes con meningitis eosinofílica muestran al menos 10 eosinófilos por mm<sup>3</sup> de LCR o  $\geq 10\%$  de eosinófilos en el recuento total de leucocitos en LCR (96), (97). El período de incubación para el desarrollo de meningitis eosinofílica es de aproximadamente dos semanas, lo que coincide con el tiempo que tardan las L3 en migrar al tejido del SNC y desencadenar una reacción inflamatoria. Sin embargo, puede variar de un día a varios meses en dependencia del número de parásitos albergados (98), (99).

La angiostrongiliasis es una enfermedad aguda que se resuelve espontáneamente en unas pocas semanas, rara vez conlleva secuelas y raramente es fatal. La duración media es de 20 días, pero puede variar de 6 a 34 días (98).

El patrón clásico de la tríada de la meningitis (dolor de cabeza, rigidez en el cuello y fiebre) se observa con frecuencia en pacientes con diagnóstico de meningitis, aunque los tres síntomas no siempre están presentes. Un análisis exhaustivo de los síntomas en 484 pacientes reveló la presencia de dolor de cabeza en 99,0%, rigidez en el cuello en 64,0% y fiebre en solo 37,0% de los pacientes (100). La cefalea es causada principalmente por el aumento de la presión intracraneal (PIC) por la acción directa de la larva, puede ser intermitente, frecuente y severa al principio; cuando se realiza una punción lumbar, se presenta con menos frecuencia y severidad y eventualmente, se resuelve por si sola (100).

La rigidez de nuca usualmente es leve y dura cortos periodos de tiempo, aunque es poco común, se informa fundamentalmente en casos severos (101). Por otro lado, se puede presentar además parestesia la cual persiste por un periodo menor de dos semanas. Ocurre con frecuencia en las extremidades, se expresa con dolor, entumecimiento, picazón o una sensación de hormigueo bajo la piel. Los vómitos y nauseas probablemente se relacionan con el aumento de la PIC (102). Otros síntomas se pueden presentar tales como: parálisis facial, fotofobia y diplopía. La alta PIC y el daño cerebral y pulmonar pueden precipitar la aparición de inconciencia, coma y muerte en casos severos (5).

En los niños, las manifestaciones clínicas suelen presentarse de forma diferente que en los adultos. La rigidez de nuca y parestesias son observadas con menor frecuencia en los niños, no así, los vómitos y náuseas (82,0%), la fiebre en 80,0%, la somnolencia en 82,0%, la constipación en 76,0%, y el dolor abdominal en 34,20% (5).

Además, las tasas de fiebre, somnolencia, estreñimiento (76,0%), y el dolor abdominal se presentan con más frecuencia en niños que en adultos. En adultos o niños con infecciones graves, pueden ocurrir el coma y la muerte (4). En ausencia de reinfección, las larvas mueren con el tiempo y la inflamación que las acompaña disminuye. La mayoría de los pacientes con angiostrongiliasis tienen un curso autolimitado y se recuperan por completo (97).

La invasión al globo ocular por *A. cantonensis* es un evento raro (5), se ha informado en aproximadamente 1% de los casos. Ocurre cuando la larva ingresa a la cámara anterior o posterior. El mecanismo exacto de entrada al ojo no está claro, pero se cree que es secundario al viaje a lo largo de la arteria retiniana entre el nervio óptico y la vaina (41), que puede manifestarse con visión borrosa unilateral sin signos de meningitis (103).

En estudio previo de 654 pacientes con sospecha de angiostrongiliasis, siete individuos (1,10%) manifestaron compromiso ocular y el síntoma más común fue visión borrosa, sin signos de meningitis eosinofílica, con un periodo de incubación de dos semanas a dos meses (104). En otras publicaciones, se notifican otros hallazgos que incluyen parálisis del músculo recto lateral, parálisis facial, glaucoma, uveítis, inflamación y atrofia del disco óptico, alteraciones del pigmento retiniano y de las vías subretinianas, retinitis necrotizante y desprendimiento de retina (105).

La fisiopatología de la angiostrongiliasis cerebral se atribuye principalmente al movimiento larvario y también involucra enzimas proteolíticas y agentes proinflamatorios y citotóxicos que son liberados por los gránulos de eosinófilos. Estas enzimas y agentes exacerban las lesiones del tejido cerebral junto con la insuficiencia vascular debido a la inflamación, que puede provocar daño neurotrófico permanente. Este proceso inflamatorio conduce a la muerte larval en las meninges, lo que a su vez exagera la inflamación (4).

Los estudios de necropsia de casos de angiostrongiliasis humana revelan (2):

a) infiltración meníngea por eosinófilos, macrófagos y linfocitos.

b) alteraciones dentro del parénquima cerebral asociadas con restos celulares, microtrombos y células inflamatorias.

c) presencia de granulomas eosinófilos y, a veces, cristales de Charcot-Leyden que rodean la larva.

La hipótesis de que la función principal de los eosinófilos es defender a los hospederos contra la infección por organismos relativamente grandes, como los helmintos parásitos, se basa en la acumulación de observaciones tales como: (a) los eosinófilos se degranulan y pueden matar a los helmintos *in vitro* en presencia de anticuerpos y/o complemento; (b) se movilizan en la sangre y se agregan en donde están los helmintos *in vivo*; (c) a menudo se ven grandes cantidades de eosinófilos en estrecha asociación con helmintos intactos y dañados *in vivo* y (d) se degranulan claramente en las proximidades o sobre las superficies de los helmintos *in vivo* (106).

Las infecciones por helmintos se caracterizan por altas respuestas de tipo IgE y un mayor número de eosinófilos circulantes. Dichos eosinófilos se activan y muestran una marcada capacidad para matar una variedad de helmintos diana *in vitro*. Puede producirse una activación adicional en respuesta a mediadores de mastocitos liberados como resultado de la degranulación dependiente de IgE, así como de IgG y complemento que pueden mediar en la unión y muerte de eosinófilos (106).

En modelos murinos, el papel de los eosinófilos en la respuesta inmune contra *A. cantonensis* ha sido estudiado. En este sentido, una mayor sobrevivencia de gusanos intracraneales se obtiene cuando la respuesta de eosinófilos se inhibe luego del tratamiento con anticuerpos anti-interleucina (IL)-5. En cambio, ratones que sobreexpresan IL-5, citocina importante asociada con la progresión de eosinofilia que sigue a la infección por *A. cantonensis*, provocan la muerte de gusanos más rápido y las hembras son más pequeñas que las aisladas en el ratón tipo salvaje (107). La eosinofilia en el LCR de ratones infectados es causada por IL-5, con aumento de eosinófilos involucrados activamente en la muerte de los gusanos intracraneales. La acumulación intensa de eosinófilos alrededor de los gusanos en los espacios subaracnoideos, sugiere la posterior muerte del gusano. Los parásitos son invadidos por numerosos eosinófilos y ultraestructuralmente, los materiales lisosomales derivados de los eosinófilos se acumulan extensamente a lo largo de las superficies cuticulares dañadas e irregulares de los parásitos (107).

Los antígenos de los helmintos estimulan preferentemente la activación de los linfocitos T-cooperadores (Th, del inglés, *T helper cells*) 2, lo que determina un patrón de secreción de citocinas (IL4, IL5, IL10) que a su vez estimulan la proliferación de células B y la secreción de Igs (108).

Se ha demostrado en hospederos infectados con helmintos que la IL-5 se encuentra en niveles elevados durante la respuesta inmunitaria activada por Th2. Esta citocina parece ser importante en las respuestas inmunitarias de las mucosas y es responsable de la eosinofilia inducida por helmintos (109).

El ratón infectado con *A. cantonensis* desarrolla una marcada eosinofilia periférica, tanto en la médula como en el LCR y se plantea que la muerte de los gusanos intracraneales puede estar estrechamente asociada con el rápido aumento de eosinófilos en el LCR (110).

La inyección intraperitoneal de anticuerpo monoclonal (AcM) anti-IL-5 en ratones suprime eficazmente la respuesta eosinofílica y en consecuencia los gusanos intracraneales sobreviven y migran a los pulmones. La infección por *A. cantonensis* causa la producción de IL-5 que juega un papel importante en la inducción de la eosinofilia y la subsiguiente muerte de los gusanos (107), (111).

En resumen, la patogenia de la meningitis eosinofílica se relaciona con el desarrollo de reacciones inflamatorias significativas en respuesta a las larvas de *A. cantonensis* que residen en el sistema nervioso. Como consecuencia, se reclutan eosinófilos y se liberan varios agentes citotóxicos potentes en un intento para eliminar el patógeno. Este ataque inmunomediado con frecuencia resulta en daño tisular y finalmente, puede exacerbar la gravedad de la enfermedad (112).

### 2.11. Diagnóstico

Un diagnóstico presuntivo, se puede establecer en base a lo siguiente:

- Síntomas y signos característicos.
- Un historial de exposición, que incluya:
  - Residencia o viajes a una zona endémica.
  - Ingestión y/o contacto de caracoles o babosas (hospederos intermediarios) crudos o poco cocinados, ya sea intencionada o no.

- Ingestión de verduras o frutas crudas, sin lavar o lavadas inadecuadamente.
- Ingestión de hospedadores paraténicos crudos o poco cocinados.
- Consumo de bebidas potencialmente contaminadas (zumo de verduras crudo o licuado) (52) (100).
- Meningitis eosinofílica, diagnosticada mediante punción lumbar (PL) y análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) (113).

Un diagnóstico presuntivo basado en los criterios relacionados anteriormente debe considerarse una base suficiente para iniciar el tratamiento (100).

### **2.11.1. Métodos diagnósticos basados en morfología**

El estándar de oro para el diagnóstico definitivo lo constituye la identificación de larvas o adultos jóvenes en LCR de pacientes. El hallazgo de larvas en el LCR es poco usual (114), (115), (116), (117).

La evidencia que define la presencia del parásito es el hallazgo de gusanos adultos que infectan a la población local de roedores (hospederos definitivos). Tradicionalmente, esto se realiza mediante la búsqueda de los gusanos adultos en las arterias pulmonares de los roedores durante la necropsia y la posterior identificación de las características morfológicas específicas de la especie (13), (7).

La búsqueda de *A. cantonensis* en hospederos intermediarios y paraténicos se realiza mediante la digestión de sus tejidos con una solución de HCl-pepsina (118) y la posterior identificación de L3, para lo cual se necesita de personal capacitado que reconozca las características morfológicas del parásito (119), (120), (121).

Los tejidos del corazón, los pulmones y el cerebro fijados con formalina se tiñen con hematoxilina y eosina, para la identificación microscópica del parásito. Para situaciones en las que no es posible la captura de roedores, la observación de L1 de *A. cantonensis* en las heces de los hospederos definitivos es indicativo de infección. El aislamiento de L1 a partir de material fecal se produce después de remojar las heces en agua y se recogen con la utilización del aparato de Baermann (122).

### 2.11.2. Métodos diagnósticos basados en técnicas inmunológicas

El inmunodiagnóstico proporciona una fuerte evidencia de apoyo al diagnóstico (123), lo que resulta apropiado para el manejo efectivo de la enfermedad. Las técnicas como el ensayo ELISA, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta e inmunoelectroforesis se emplean con esta finalidad (124), (114). En caso de que no se encuentren larvas, el diagnóstico podría apoyarse en técnicas inmunodiagnósticas de detección de anticuerpos, tales como inmunotransferencia y ELISA con la utilización de antígenos de 29 o 31 kDa del parásito (125), (126), (127). Se requiere de una interpretación cuidadosa de los resultados debido a la considerable variabilidad de los métodos en cuanto a sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos (126).

Entre los factores que pueden afectar los resultados de la inmunotransferencia se encuentran el número de muestras de suero analizadas, los antígenos derivados de diferentes etapas de vida de los parásitos y/o los epítomos antigénicos compartidos entre diferentes especies de parásitos que dan como resultado falsos positivos (128). La demostración de una banda que señale la presencia de un anticuerpo específico en un suero contra el antígeno de *A. cantonensis* de 31 kDa indica infección con *A. cantonensis* (129). La purificación de estas proteínas por electroelución a partir de geles de poliacrilamina-SDS resulta ser una técnica óptima para la obtención de antígenos con buena especificidad (130). Además, la utilización de una proteína de 204 kDa de L5 de *A. cantonensis* en el inmunodiagnóstico proporciona al sistema una sensibilidad y especificidad de 91,0% y 98,0%, respectivamente (131).

Por otra parte, en un estudio de evaluación de la respuesta específica de varias subclases de Igs, en particular para la proteína 29 kDa, se identifica a la subclase IgG<sub>1</sub> como la de mayor respuesta de anticuerpos anti-*Angiostrongylus* (132). Una investigación posterior muestra la utilidad de la subclase IgG<sub>4</sub> en el diagnóstico de esta entidad al obtenerse una banda antigénica de una masa molecular de 29 kDa. El método muestra una sensibilidad de 75,0% y una especificidad de 95,0% (133).

Una limitación importante de la detección de anticuerpos para el diagnóstico es que la producción de anticuerpos en suero tiene lugar posterior a la aparición de síntomas agudos, a veces significativamente. En un brote en Jamaica en el año 2000, sólo 8,0% de las muestras de suero en fase aguda (recolectadas entre 5 y 18 días después del inicio

de los síntomas) fueron positivas, mientras que en fase de convalecencia 83,0% de los sueros (recolectadas entre 31 y 45 días después del inicio de los síntomas) resultaron positivos (51).

Mediante el empleo de un AcM, que reconoce un epítipo de una proteína de peso molecular de 204 kDa del parásito, en un ELISA de doble anticuerpo, se realizó la detección de antígenos circulantes en pacientes con meningitis o meningoencefalitis eosinofílica, a partir de la semana tres post-infección. El inmunodiagnóstico mediante esta técnica demuestra alta especificidad en la detección de antígenos circulantes en muestras de suero y LCR; sin embargo, la sensibilidad en LCR fue significativamente mayor que en suero (134).

Otros AcMs (12D5 y 21B7) muestran gran utilidad en el diagnóstico de *A. cantonensis* al detectar una proteína de 55 kDa en 100% (32/32) de sueros de pacientes con angiostrongiliasis. Estos anticuerpos no presentaron reacción cruzada con sueros de pacientes con clonorchiasis, fasciolopsiasis, anquilostomiasis, anisakiasis, así como esquistosomiasis (135). En un estudio en el que también se emplea un AcM (AW-3C2) contra antígenos de la forma adulta del parásito se alcanza una especificidad de 100% y una sensibilidad de 50,0% al utilizar un ELISA tipo doble anticuerpo en la detección de antígenos propios del parásito (136).

En otros trabajos más recientes se generaron cuatro AcMs contra los antígenos de excreción-secreción (AgES) de gusanos adultos de *A. cantonensis*, dos corresponden a la subclase IgG<sub>1</sub> y dos al isotipo IgM. La inmunotransferencia revela que los cuatro AcMs reconocen, predominantemente, un antígeno de 98 kDa en los AgES de gusanos adultos de *A. cantonensis*, y no se encuentran reacciones cruzadas con los antígenos de gusanos completos de otros parásitos (137).

En un estudio ciego en nueve laboratorios regionales de Tailandia se normalizó un ensayo *dot-blot* ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra una proteína de 31 kDa de *Parastrongylus cantonensis*. La prueba mostró una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 100% en todos los laboratorios incluidos en el estudio (138).

A pesar de las investigaciones que avalan el uso de las pruebas serológicas, hay autores que plantean que las mismas no siempre están disponibles en zonas aisladas. En este sentido, se propuso un inmunoensayo de flujo lateral, método rápido en que se emplean

dos AcMs contra antígenos de *A. cantonensis*, y tiene una sensibilidad y especificidad informada de 91,10% y 100% respectivamente (139).

Otro método que se utiliza con éxito en el inmunodiagnóstico específico de angiostrongiliasis cerebral, es un inmunoensayo rápido en fase sólida (DIGFA). Este método emplea una membrana de nitrocelulosa como soporte de la reacción, la glucoproteína de 31 kDa específica de *A. cantonensis* como antígeno y el oro coloidal conjugado con proteína A en la detección del complejo antígeno-anticuerpo. La prueba ha mostrado valores de sensibilidad y especificidad de 100% (140).

En el año 2018, se publicó un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral rápido (Prueba AcQuickDx) para la detección de anticuerpos anti-*A. cantonensis* en suero humano. En el método se empleó como antígeno la glucoproteína de 31 kDa específica de *A. cantonensis* e IgG anti-humana marcada con oro coloidal para la detección del complejo antígeno-anticuerpo. El ensayo alcanzó una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 100%, 98,72%, 95,0% y 100%, respectivamente (141).

En un estudio más reciente se realizó la comparación de las pruebas serológicas AcQuickDx, *dot-blot* ELISA y DIGFA para la determinación de la validez de los ensayos. Cerca de 40% de las muestras resultaron positivas por AcQuickDx, con una especificidad de 75,50%. Para los ensayos DIGFA y *dot-blot* ELISA se obtuvieron sensibilidad y especificidad de 39,70% y 75,50%; 37,75% y 76,70%, respectivamente (142).

Por otra parte, otros investigadores utilizan la galectina-2, en forma recombinante rAcGal2, de gusanos hembras adultas jóvenes de *A. cantonensis* como antígeno para el desarrollo de una prueba inmunocromatográfica. EL valor diagnóstico de la prueba se evaluó y se comparó con los resultados de un ensayo ELISA. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de la prueba inmunocromatográfica fueron 87,0%; 96,47%; 94,56% y 91,37%, y para el ensayo ELISA de 91,09%; 97,19%; 95,77% y 94,0%, respectivamente. La concordancia de la prueba inmunocromatográfica fue de 93,90% (143). Recientemente, se realizó un estudio en donde se comparan fracciones antigénicas de diferentes fases de desarrollo de *A. cantonensis* con la utilización de los ensayos *dot*-ELISA e inmunotransferencia, con resultados promisorios (144).

### 2.11.3. Métodos diagnósticos basados en la amplificación de ácidos nucleicos

La detección molecular mediante la PCR se utiliza para eludir los problemas asociados con la identificación morfológica del parásito.

El ADN genómico adecuado para la detección por PCR puede extraerse de varios tipos de material, incluyendo gusanos intactos en todas las etapas de desarrollo, tejidos de huéspedes intermedios, definitivos y paraténicos, y excrementos de rata. Los primeros métodos publicados para la detección de *A. cantonensis* utilizaban PCR para amplificar cebadores de regiones conservadas de los genes, seguido por análisis de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés, *restriction fragment length polymorphism*) del producto amplificado mediante la PCR (145), (146).

Se han desarrollado diferentes pruebas moleculares útiles en la detección de parásitos. Su especificidad y sensibilidad se incrementa gradualmente, lo que trae consigo que los parásitos que antes eran difíciles de diagnosticar mediante técnicas convencionales comenzaron a identificarse mediante técnicas moleculares. Los métodos de diagnóstico de laboratorio actuales para la detección de parásitos incluyen: PCR, qPCR, LAMP, ADN polimórfico amplificado al azar con tecnología luminex (RAPD, siglas en inglés, *random amplification polymorphic*), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP, siglas en inglés, *amplified fragment length polymorphism*), RFLP, además de microsatélites (147).

A medida que se disponen de datos de secuenciación de ADN a partir de la identificación de un mayor número de especies de *Angiostrongylus* se diseñan nuevos ensayos de PCR específicos de especie.

Eamsobhana y colaboradores, en el año 2013 estudian muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un grupo de pacientes diagnosticados clínicamente y con anticuerpos específicos de *A. cantonensis*, mediante un método la PCR utilizando cebadores obtenidos a partir del gen que codifica para la proteína nativa de 66 kDa. El método de la PCR detectó el ADN de *A. cantonensis* en las muestras de LCR de cuatro de los diez pacientes estudiados (148).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés *Centers For Disease Control*), en colaboración con el grupo de parasitología de la Pontificia Universidad Católica de Rio Grande do Sul (PUCRS) desarrollaron una prueba de

qPCR a muestras de LCR humano utilizando como blanco ITS-1, estos resultados preliminares son prometedores para la identificación de la infección en humanos (149).

En otro trabajo más reciente publicado en 2016, en 22 de 33 (67,0%) LCR de pacientes se detectó ADN de *A. cantonensis* por qPCR, utilizando cebadores que amplifican una región del gen que codifica para ITS-1 (150).

Otra técnica que se utiliza es la secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés, *next generation sequencing*) que es capaz de producir miles a millones de operaciones de secuenciación a la vez, lo que permite contar en la actualidad con datos de secuencia de genoma completo para múltiples organismos bacterianos en horas (151). En otro estudio realizado en China, empleando la misma técnica, a partir del ADN extraído del LCR de pacientes con diagnóstico de meningitis eosinofílica, se construyó una genoteca de ADN. Las secuencias encontradas se compararon con las secuencias de la base de datos existente, concluyéndose que las secuencias de ADN de los LCR de los pacientes estudiados correspondían a *A. cantonensis* (152). Feng y colaboradores en el año 2020 (153) y Liu y colaboradores en 2022 (154), utilizaron también la secuenciación metagenómica de próxima generación en el diagnóstico de la angiostrongiliasis del sistema nervioso central, con excelentes resultados.

Recientemente, se ha desarrollado un ensayo qPCR, en el que se utiliza una región del genoma de *A. cantonensis* que se predice que es altamente repetitiva, que es capaz de detectar al parásito con una alta sensibilidad (155).

Además, se ha desarrollado la técnica RPAcan3990, que es un ensayo molecular que permite realizar un diagnóstico rápido en el sitio de atención al paciente. Este método ultrasensible emplea la enzima polimerasa recombinasa y es capaz de detectar *A. cantonensis* con alta sensibilidad, produciendo resultados visualmente interpretables, con una instrumentación mínima (156).

En Tailandia se describieron dos casos de angiostrongiliasis ocular, parasitológicamente confirmados, después de recuperar quirúrgicamente los parásitos de la cámara anterior de los pacientes, los cuales se identificaron, desde el punto de vista morfológico, como *Angiostrongylus* sp. El análisis molecular permitió la identificación de *A. cantonensis* después de amplificar toda o parte del ARNr SSU nuclear, la ITS-2 y la *co 1*, seguida de la secuenciación de las cadenas nucleotídicas (157).

Asimismo, fue normalizada también la técnica de LAMP, los cebadores se diseñaron en base al blanco genético ITS-1 del ADN ribosómico nuclear (ADNr) de *A. cantonensis*. Las pruebas de especificidad muestran que el sistema sólo detecta ADN de *A. cantonensis* y no así de muestras control de *Anisakis simplex*, *Trichuris trichiura*, *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* y *Ascaris lumbricoides*. La evaluación de la sensibilidad indica que el ensayo LAMP es 10 veces más sensible que la PCR convencional. Se recomienda su empleo en la detección rápida y sensible de *A. cantonensis* en caracoles, lo que tiene implicaciones para el control efectivo de la angiostrongiliasis (158).

Por otra parte, la qPCR además de detectar ADN del parásito, proporciona una medida confiable de la carga de parásitos en hospederos intermediarios. La cuantificación de los niveles de infección de los hospederos intermediarios es crítica para determinar la intensidad de la infección por *A. cantonensis*. La identificación de "puntos calientes" de infección permite tomar medidas más eficaces de control de ratas y babosas. Además, esta técnica es más eficiente y sensible que la microscopía y constituye una herramienta no solo para la cuantificación de larvas en hospederos intermediarios sino también potencialmente en otras fuentes tales como los alimentos, ejemplo lechugas (159). En este sentido, se ha desarrollado un ensayo de qPCR que amplifica la región específica de ITS-1 y permite la detección de L3 de *A. cantonensis* en hospederos intermediarios. El método detecta una concentración de ADN equivalente a una L3. La especificidad del ensayo fue analizada con ADN de *Clonorchis sinensis* y *Gnathostoma spinigerum* de moluscos infectados y el método detecta específicamente *A. cantonensis* (160).

Otro ensayo de qPCR, dirigido a ITS-2 se normalizó con el propósito de detectar larvas L1 de *A. cantonensis* en heces de rata. La prueba fue capaz de detectar una sola L1 en un gramo de heces frescas. Con *Strongyloides ratti*, *Syphacia obvelata*, *Hymenolepis nana*, e *Hymenolepis diminuta* no se obtuvo amplificación de la señal mayor que el umbral de detección (161).

En otro estudio, se extrajo el ADN de 26 ratas de laboratorio a partir de sangre total y secciones de tejido de la cola y se sometió a la qPCR utilizando cebadores específicos de la especie para la región del espaciador transcrito interno (ITS-1). El ADN del parásito puede detectarse en la sangre periférica en varios puntos temporales a lo largo de la infección en ratas, lo que podría ser útil en estudios destinados a cuantificar la tasa de infección por *A. cantonensis* de las ratas en una zona determinada (162).

#### 2.11.4. Diagnóstico por imágenes de resonancia magnética.

Las imágenes de resonancia magnética (IRM) en pacientes con meningitis eosinofílica por *A. cantonensis* a menudo revelan múltiples engrosamientos nodulares en el tejido cerebral y engrosamientos lineales en las leptomeninges (163). Sin embargo, son relativamente inespecíficas y no pueden proporcionar un diagnóstico sin el uso concomitante de otros métodos de laboratorio (149), (164). No obstante, estudios posteriores realizados con ratas muestran que es posible el diagnóstico de infección con el uso IRM y que el seguimiento del proceso infeccioso por esta vía, ofrece información útil para revelar los efectos de la angiostrongiliasis en diferentes áreas del cerebro. Los resultados del estudio apoyan el uso de IRM como técnica, no invasiva, de diagnóstico de infección por *A. cantonensis* (165).

Un estudio de 27 pacientes con diagnóstico clínico de angiostrongiliasis revela, con el empleo de IRM, engrosamiento de las meninges en 16 pacientes (59,25%), engrosamiento de las meninges y nódulos intracraneales en cuatro pacientes (14,80%), nódulos intracraneales en otros cuatro pacientes (14,80%), engrosamiento de las meninges y engrosamiento vascular perimeníngeo en un paciente (3,70%), y engrosamiento vascular perimeníngeo en dos pacientes (7,40%). La principal manifestación en este estudio fue meningitis acompañada de encefalitis y vasculitis en algunos casos (43).

En otro estudio, en la IRM se encuentra realce leptomeníngeo difuso en el cerebro y la médula espinal, áreas de infarto cortical puntiformes y difusas y realce intramedular en la medula espinal T8-L5 (43).

### **2.12. Otras causas de etiología parasitaria que provocan meningoencefalitis eosinofílica**

De las múltiples etiologías descritas que son causa de meningitis eosinofílica, es de destacar, por su frecuencia, la parasitaria y concretamente, como ya fue mencionada, la asociada al género *Angiostrongylus*.

La segunda causa parasitaria que puede provocar una meningitis eosinofílica es la cisticercosis, producida por *Taenia solium*. Esta parasitosis afecta al SNC en 60-90% de los casos y produce meningoencefalitis en 5% de los mismos. El diagnóstico se realiza por técnicas de neuroimagen como la tomografía axial computarizada y la IRM, y por

técnicas serológicas como el método ELISA, que tiene una sensibilidad de 65-75% y una especificidad variable entre 63 y 91% (166).

Otras helmintiasis que están implicadas en la meningitis eosinofílica son la gnathostomiasis (*Gnathostoma spinigerum*) y la paragonimiasis (*Paragonimus* sp.) (167). La meningoencefalitis en estos pacientes suele presentar un curso más lento que la producida por *A. cantonensis*, sin embargo, la inflamación severa y la destrucción tisular que se produce en la gnathostomiasis puede provocar hemorragias cerebrales agudas, con un curso que puede ser fatal (168).

Otros agentes infecciosos también asociados con la meningitis eosinofílica, pero mucho menos frecuentes son *Trichinella spiralis* (169) y *Toxocara canis* (170).

### **2.13. Caracterización filogénica de *Angiostrongylus cantonensis***

Los aspectos genéticos de este parásito se exploran de forma sistemática y filogénica. Para ello, se emplean genes cromosomales y mitocondriales que funcionan como marcadores moleculares para la identificación específica del parásito. Además, las secuencias de estos genes se utilizan para la diferenciación molecular y los análisis filogenéticos de las especies de *Angiostrongylus* (171).

#### **2.13.1. Marcadores genéticos cromosomales**

##### **2.13.1.1. Gen de la proteína de 66 kDa**

Este gen se emplea con éxito en la amplificación del ADN genómico de tres especies de *Angiostrongylus* (*A. cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. malaysiensis*) (172). También se utiliza en la identificación y delimitación de especies, así como en el estudio de la diversidad genética, la estructura de poblaciones y la filogeografía (173).

##### **2.13.1.2. Secuencias ITS**

Las secuencias ITS se conservan entre los aislamientos de *A. cantonensis*, pero difieren de las otras especies de *Angiostrongylus*. Esto proporciona marcadores genéticos útiles para la identificación específica y la caracterización genética de *Angiostrongylus* sp. (173), (174). El marcador ITS-1 se utiliza en el análisis de secuencia de *A. costaricensis*, *A. vasorum* y *A. cantonensis*, mientras que, ITS-2 es ampliamente utilizado en la identificación de especies de nematodos (174). Con el empleo de ambos marcadores se muestra alta variabilidad interespecífica y baja intraespecífica (175).

En un estudio realizado por Liu y colaboradores en el año 2011 en Shenzhen, Qingyuan, Jiangmen, y Wenzhou en China, en el que utilizan como marcador genético el gen ITS obtienen secuencias conservadas entre aislamientos de *A. cantonensis*. Sin embargo, muy diferentes a las de otras especies de *Angiostrongylus* (176). En otros estudios, con el empleo de las secuencias ITS-2 se alcanza la diferenciación entre *A. cantonensis* y *A. malaysiensis* (177).

#### 2.13.1.3. Gen del ARN ribosómico de la subunidad pequeña

De igual modo, el marcador de ARNr SSU resulta útil en la detección de nematodos del tercer estadio juvenil infeccioso de *A. cantonensis*. Este nematodo en tercer estadio presenta una secuencia única que permite también la diferenciación de otros angiostrongílidos y conocer la posición filogenética de otros nematodos no angiostrongílidos (178). Las secuencias obtenidas se han usado en la construcción de árboles filogenéticos de cinco especies de *Angiostrongylus*, a saber: *A. cantonensis*, *A. costaricensis*, *Angiostrongylus dujardini*, *A. malaysiensis* y *A. vasorum*. Esta técnica molecular constituye un método rápido y preciso que permite la detección de *A. cantonensis* cuando la identificación morfológica resulta difícil o inadecuada (179).

Otro estudio sugiere que mientras el gen ARNr SSU no resulta útil en la detección de diferencias intraespecíficas, podría ser un marcador adecuado para el análisis de las relaciones interespecíficas entre especies de *Angiostrongylus* (180). Además, otros autores también consideran que es un marcador útil en la identificación de *A. cantonensis* y en la diferenciación de otras especies de *Angiostrongylus* (173).

#### 2.13.2. Marcadores genéticos mitocondriales

Por años, el estudio de la morfología de las especies ha sido la piedra angular para la identificación de parásitos, sin embargo, no siempre ha sido del todo exitosa, debido a la gran similitud que existe en la morfología de las especies dentro de los distintos phylum. Sin embargo, la utilización de herramientas moleculares como la PCR y la tecnología de secuenciación de ADN, han contribuido con la identificación taxonómica correcta de los diferentes phylum de parásitos, superando las limitaciones asociadas al análisis morfológico (181). El proceso de comparación de las secuencias genéticas se denomina caracterización genética. Para establecer la relación de parentesco entre las secuencias se realiza el análisis filogenético. Los métodos moleculares permiten la comparación de taxa para la evaluación de las diferentes características sinapomórficas.

(182). La información genética ha proporcionado a los investigadores la capacidad de reconocer a numerosas especies, aclarar la plasticidad fenotípica, relacionar las etapas de ciclo de vidas, inferir la filogenia y poder realizar una exploración de la variación geográfica más allá de lo que se podría inferir de los datos morfológicos por si solos (181).

El ADN mitocondrial (ADNmt), pequeña fracción de los genomas de los organismos, constituye el marcador más utilizado en los estudios de diversidad molecular en los metazoos en las últimas cuatro décadas, lo que permite conocer la diversidad inter e intraespecies. Los genomas mitocondriales son marcadores perfectos de elección para estudios de población, biogeografía y filogenética porque son fáciles de amplificar y manipular, tienen una tasa de mutación elevada, supuestamente son de herencia clonal y experimentan una evolución neutra (171), (172).

El ADNmt de metazoa se considera el marcador de elección para la reconstrucción de relaciones filogenéticas a varios niveles taxonómicos y se utiliza ampliamente en la resolución de controversias taxonómicas. De hecho, el pequeño tamaño de la molécula, su abundancia en tejidos animales, la presencia de genes/regiones que evolucionan a ritmos diferentes, su herencia uniparental y el nivel muy bajo o ausencia de recombinación hacen que esta molécula sea confiable y un marcador filogenético fácil de usar (183).

Los genes mitocondriales incluyen: *co1* y *cyt B*.

#### **2.13.2.1. Gen *citocromo oxidasa* subunidad 1**

El gen *co1* representa un buen marcador para el estudio de la evolución genética (filogenia) del parásito, en la diferenciación de especies de *Angiostrongylus* spp. estrechamente relacionadas y de aislamientos geográficos (filogeografía) de *A. cantonensis* y en la identificación de haplotipos del parásito (184), (185).

En un estudio realizado en Japón, se determinan secuencias para 83 parásitos adultos de 18 localidades geográficas de Japón, China continental, Taiwán y Tailandia. El análisis filogenético muestra 7 haplotipos distintos (ac1 a ac7). Los haplotipos son: (ac1, ac2, ac3, ac5 y ac7) en Japón (69 individuos de 13 localidades), (ac2 y ac6) en China continental (ocho individuos de tres localidades) y solo un haplotipo (ac1) en Taiwán (cuatro gusanos individuales de una localidad). Del mismo modo, solo se identifica un solo haplotipo (ac4) a partir de dos gusanos mantenidos en laboratorios de Tailandia.

Los haplotipos ac1 y ac7 al parecer constituyen los principales haplotipos a lo largo del Pacífico de Japón, mientras que ac5 es el principal haplotipo en las islas Ogasawara y Okinawa. Los haplotipos japoneses ac1 y ac2 podrían relacionarse con el haplotipo taiwanés ac1 y con el haplotipo chino ac2, respectivamente. La menor variación genética y la distribución geográfica particular de *A. cantonensis* en cada ubicación podría indicar un efecto fundador, como resultado de múltiples orígenes independientes y sugiere la posible migración de los haplotipos desde áreas endémicas a través del transporte humano (186).

En Brasil, los análisis filogenéticos llevados a cabo por Monte y colaboradores en 2012 con secuencias parciales de *col* de *A. cantonensis*, a partir de 15 aislamientos, muestran la presencia de tres haplotipos diferentes: ac5, ac8 y ac9, con predominio de los haplotipos ac5 o ac8. Además, ac9 se describió como un haplotipo nuevo. Los datos obtenidos en este estudio muestran que el aislado de *A. cantonensis* de Caju (estado de Río de Janeiro) que corresponde a ac9, está restringido al área del puerto y se sugiere la posible entrada de este haplotipo al país desde Asia, a través del comercio. El factor que podría limitar la dispersión del mismo a otros lugares del país es la ausencia del principal hospedero intermedio, *L. fulica*, en la zona portuaria. De manera similar, se considera que los aislados brasileños de Pirituba (estado de São Paulo), Queimados y Niterói (estado de Río de Janeiro), que corresponden al haplotipo ac5 de Japón, ingresan al país a través de Río de Janeiro o São Paulo también desde el continente asiático. Esta hipótesis también se considera para el haplotipo brasileño más abundante (ac8), que muestra la posible propagación del parásito a través de *L. fulica* a las regiones del sudeste, noreste y norte (187).

En un estudio más reciente, secuencias de *A. cantonensis* provenientes de Tailandia y Camboya se clasificaron en 13 haplotipos distintos (173). Dos de estos haplotipos de *A. cantonensis* (ac2 y ac5) se habían informado previamente en Brasil (187) y Asia (186). Una muestra de Myanmar exhibió el haplotipo ac2. Además, se encontraron cuatro nuevos haplotipos ac10, ac11, ac12 y ac13, no notificados previamente en Tailandia y Camboya (173).

Otro estudio, realizado por Eamsobhana y colaboradores en 2017, muestra distintos haplotipos de *A. cantonensis* en siete regiones de Tailandia: ac10 en Phitsanulok (región norte), ac11 en Nakhon Phanom (región noreste), ac15 en Trat (región este), ac16 en Chantaburi (región este), ac4 en Samu Prakan (región central), ac14 en Kanchanaburi

(región occidental) y ac13 en Ranong (región sur). Además, se identifican tres haplotipos nuevos ac14, ac15 y ac16 (188).

En resumen 16 haplotipos (ac1-ac16) se informan en el mundo. Los haplotipos ac1, ac2, ac3, ac5 y ac7 en Japón, ac5, ac8 y ac9 en Brasil y ac6 en China. En tanto que los haplotipos ac 4, ac10, ac11, ac12, ac13 ac14 y ac15 y ac16 se encuentran en Tailandia.

#### **2.13.2.2. Gen de *citocromo B***

*Citocromo B*, un componente del complejo de la cadena respiratoria III (EC 1.10.2.2), es un gen mitocondrial de uso común para la identificación de especies y el análisis de las relaciones filogenéticas (189). También se acepta como un buen marcador en el establecimiento de patrones filogeográficos (190).

En un estudio realizado en ocho localidades de Tailandia se encuentran diferencias filogenéticas dentro de las poblaciones de *A. cantonensis*, con 11 haplotipos de *cyt B* diferentes (MHS-1, MHS-2, NAN-1 LB-1, LB-2, NST NAN-2, PCK-1, PCK2, PSL, KCB, BKK-1BKK-2). Los mismos haplotipos fueron encontrados en áreas remotas, lo que indica que la variación genética en una zona geográfica estrecha no es efecto de la evolución del parásito en Tailandia. Si bien se encontraron varios haplotipos, la baja variación genética y distribución geográfica de *A. cantonensis* en cada ubicación, indica un efecto fundador, que puede haber resultado de múltiples orígenes independientes, y sugiere que los haplotipos migraron de áreas endémicas a través de actividades de transporte de hospederos intermediarios y definitivos relacionadas con los humanos (191). Recientemente, en un estudio realizado en Tailandia se obtienen un total de 15 haplotipos *cyt B* (ac1-ac15) a partir de 37 secuencias de 14 localidades geográficas que abarcan las regiones norte, oeste, este, centro y sur encontrándose, al parecer, algunos de estos haplotipos limitados a localidades geográficas específicas. Las secuencias nucleotídicas parciales de *cyt B* de aislamientos de *A. cantonensis* de Tailandia quedaron agrupados en un clado diferentes a China y Hawai (192).

Por otra parte, Dumidae y colaboradores, señalan que las secuencias de *cyt B* de *A. cantonensis* (10 especímenes) de la provincia de Chaiyaphum están estrechamente relacionados con los haplotipos *cyt B* ac1-ac8 encontrados en otras provincias de Tailandia. Sin embargo, la mayoría de las secuencias (seis muestras) son similares al haplotipo *cyt B* ac1, lo que sugiere que este puede ser el haplotipo dominante en

Tailandia. Además, identificaron dos nuevos haplotipos de *cyt B*: ac19 (tres secuencias) y ac20 (una secuencia) (180).

Según Peng y colaboradores, se identificaron 42 haplotipos. (h1-h42) de un total de 520 gusanos de *A. cantonensis* obtenidos de 13 localidades del sur de China, Taiwan, y Laos. La notable diferenciación genética entre aislamientos indica un bajo flujo de genes entre las poblaciones de *A. cantonensis* en las diferentes áreas estudiadas. El patrón estructurado de los linajes filogenéticos no presenta una correspondencia precisa con la distribución geográfica, lo que subraya la naturaleza complicada de rastrear la dinámica poblacional de esta especie (177).

#### **2.14. Prevención y tratamiento**

La amplia distribución de hospederos definitivos, e intermediarios para *A. cantonensis* presentes en el mundo, nos conduce a la reflexión de que las estrategias para prevenir las infecciones no pueden centrarse simplemente en la erradicación del parásito (193). Sin embargo, es posible el bloqueo de la transmisión de enfermedades con la educación de las poblaciones en riesgo. Otra forma de contribuir a la prevención es evaluar los conocimientos de los trabajadores de la salud y valorar la necesidad de realizar intervenciones educativas. La realización de cursos en forma de intervención educativa, que permite perfeccionar el trabajo de estos profesionales, ha producido una mejoría estadísticamente significativa de las evaluaciones, lo que demuestra la eficacia de las intervenciones (194). Ello evidencia la necesidad de programas educativos basados en conferencias, cursos, distribución de material científico actualizado, etc, para garantizar mayor eficiencia en el trabajo de médicos de atención primaria en relación con el diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades parasitarias (195).

Los métodos recomendados para la prevención de la infección por *A. cantonensis* incluyen (2):

- a) Educar a las poblaciones en riesgo sobre el parásito y la enfermedad que causa.
- b) Ingerir hospederos intermediarios de *A. cantonensis* cocinados adecuadamente.
- c) Erradicar hospederos intermediarios y definitivos cerca de casas y huertos.
- d) No ingerir vegetales sin lavar, los cuales pueden estar contaminados.
- e) Control de poblaciones de roedores.

Sin embargo, se conoce que el cumplimiento de algunas de estas recomendaciones es difícil en poblaciones con hábitos nutricionales e higiénicos incompatibles con un buen

control de la enfermedad. Por otra parte, también es importante educar al personal de atención médica, sobre todo a los médicos, tanto en regiones no endémicas como endémicas, para que sean conscientes del riesgo potencial de este parásito, de los síntomas comunes que producen y sus modos de transmisión, para poder garantizar un diagnóstico oportuno (4).

Tanto los caracoles de regiones tropicales como los de clima templados pueden ser portadores de *A. cantonensis*, lo que indica el potencial para una expansión futura del parásito, como consecuencia del cambio climático y la necesidad de considerar la angiostrongiliasis como una enfermedad infecciosa emergente.

Como han demostrado numerosos estudios a lo largo de los años, desde que se descubrió este patógeno zoonótico, su presencia y su riesgo como enfermedad emergente no han dejado de crecer, pues su distribución ya no se limita únicamente a regiones endémicas. Cabe entonces destacar la importancia que tiene el control de la propagación de *A. cantonensis* a zonas en las que actualmente no está presente (196). En algunos sitios se están utilizando trampas, carnadas y métodos de barrera para evitar la llegada de los vectores a los cultivos (197), (198).

Por tanto, prevenir la propagación de hospedadores intermediarios y definitivos de *A. cantonensis* debe ser uno de los principales objetivos de las autoridades de los países en los que se ha detectado la presencia de este parásito. Para evitar la propagación de este parásito emergente, deben adoptarse medidas de control en el transporte de mercancías en puertos y aeropuertos (16) El departamento de agricultura de EUA, rutinariamente intercepta *L. fulica* en el equipaje de viajeros internacionales de África Occidental, especialmente Nigeria, Ghana y Senegal (199).

Muchos parásitos que tienen hospederos intermediarios, como *A. cantonensis*, requieren entornos húmedos o mojados para desarrollarse y sobrevivir. Sin precipitaciones suficientes, la distribución del parásito podría volverse más restringida, lo que disminuiría el riesgo de transmisión (200). Dado que muchas especies son hospederos potenciales, es probable que los factores abióticos, en particular la temperatura y quizás la humedad, tengan una mayor influencia en las tasas de infección y la expansión continua del parásito, que la propagación de especies hospederas particulares. El conocimiento de los posibles vectores de *A. cantonensis* y sus cargas parasitarias es importante para el manejo de la salud pública (53) y para poder complementar e implementar posibles programas de control de la angiostrongiliasis.

En un estudio realizado en Tailandia, donde la angiostrongiliasis es endémica, se utilizó como método de seguimiento y control de la infección, la vigilancia de casos de meningitis eosinofílica en línea con un modelo predictivo para esta enfermedad, con la utilización de la base nacional de datos. Los valores predictivos coincidieron con los números mensuales reales de casos de meningitis eosinofílica, lo que indica un buen ajuste del modelo predictivo (201).

El manejo óptimo de la meningoencefalitis por *Angiostrongylus* se dificulta, especialmente en pacientes con cuadros neurológicos graves. Las pautas del CDC recomiendan el tratamiento de apoyo con analgésicos y antihelmínticos (mebendazol 10 mg/kg/día o albendazol 15 mg/kg/día dos semanas, respectivamente). Esto resulta en resolución de la cefalea en una media de tres días en una serie de casos que recibieron mebendazol y cuatro días en una serie de casos que recibieron albendazol, sin graves efectos secundarios (202).

El tratamiento con prednisolona a dosis de 60 mg/día por dos semanas resulta beneficioso para aliviar la cefalea en pacientes con meningitis eosinofílica (203). Aunque el tratamiento con las mismas dosis por una semana muestran los mismos resultados (204).

En ocasiones, no es recomendable el tratamiento antihelmíntico, puesto que puede provocar una respuesta inflamatoria producto de la acumulación de parásitos muertos y en consecuencia se describe una exacerbación clínica de los síntomas neurológicos.(205), (206). No obstante, se plantea que la cefalea (notificada con frecuencia) se puede reducir significativamente con albendazol en dosis de 15 mg/Kg/día con dos semanas de tratamiento (207). Recientemente, ha surgido un consenso de que los antihelmínticos son útiles, quizá incluso claves, especialmente si se administran antes o poco después de que las larvas L3 ingresen al sistema nervioso central, o al menos antes de que muden y crezcan. También se ha sugerido el uso profiláctico de antihelmínticos, en zona endémica, en caso de que la persona refiera su posible exposición al parásito (208), (209).

Alternativamente, se tratan pacientes con ivermectina oral en dosis de 200 mg/Kg/día por 10 días en combinación con metilprednisolona intravenosa en dosis de 30 mg/Kg/día por 5 días, seguido por prednisolona 2 mg/Kg/día por 1 mes. Este esquema

conduce a una disminución progresiva tanto del dolor de cabeza como de la disuria y la paraparesia de las extremidades inferiores (210).

En el contexto de la enfermedad ocular, no existe un tratamiento específico para la infección por *A. cantonensis*, usualmente se realiza un abordaje para conseguir disminución de síntomas con prednisolona tópica y metilprednisolona intravenosa, 30 mg/Kg/día por 5 días. Las opciones de tratamiento incluyen cirugía o terapia con láser. La intervención oportuna con remoción quirúrgica de la larva en cámara anterior puede evitar la ceguera y prevenir complicaciones sistémicas. Antihelmínticos como el albendazol no son recomendados antes de la remoción del parásito de la cavidad ocular porque la muerte de los mismos pueden causar inflamación intraocular (211).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Caracterización sociodemográfica del país y de las áreas de estudio**

##### **seleccionadas**

##### **3.1.1. República del Ecuador**

Se encuentra ubicada en América del Sur. Limita al norte con Colombia, al sur y al este con Perú y al oeste con el océano Pacífico, el cual lo separa de las Islas Galápagos, ubicadas a 1000 kilómetros. El territorio ocupa un área de 28.3561 km<sup>2</sup>, con más de 16 millones de habitantes. Las principales unidades del relieve ecuatoriano son la llanura costera al norte del Golfo de Guayaquil, la sección de la Cordillera de los Andes en el centro del país y un extenso sector de la llanura amazónica ubicado al oriente del país. Sesenta y tres por ciento de la población reside en zonas urbanas y 37,0%, en rurales. Cabe destacar que, dada la alta densidad poblacional y su extensión territorial reducida, la concentración de poblados es alta, por lo que las ciudades y poblados rurales se encuentran muy cerca unos de otros (212).

El territorio de la República del Ecuador se divide en: Parroquias (urbanas o rurales), las cuales conforman los Cantones, estos las Provincias, y estas a su vez las Regiones Administrativas. Cada una de estas entidades y los distritos metropolitanos tienen un gobierno autónomo descentralizado, encargado de ejecutar políticas dentro de su ámbito. Las parroquias son las divisiones de cuarto nivel en la República del Ecuador, siendo más de un millar en total. Son entidades similares a los municipios o comunas en otros países, diferenciadas a su vez en urbanas y rurales. Los cantones son las unidades territoriales de tercer nivel en Ecuador, siendo 221 en total. La República del Ecuador se divide en 24 provincias que son las unidades territoriales de segundo nivel (212) (Figura 6).



Figura 6. Mapa político de la República del Ecuador donde se muestran las 24 provincias.

Fuente: <https://provinciasecuador.com/mapa-politico-del-ecuador/>

### 3.1.2. Provincia Napo

La provincia Napo cuenta con 103.697 (213) habitantes en una extensión de 13271 km<sup>2</sup> y está dividida en cinco cantones: Tena, Archidona, Arosemena Tola, El Chaco y Quijos. Existe en la provincia una alta/moderada endemividad de moluscos hospederos intermediarios de *A. cantonensis* (26) por lo cual fue objeto de estudio para esta investigación.

#### 3.1.2.1. Cantón Tena

La población de este cantón es de aproximadamente 79.337 (213) distribuida en una superficie de 3 904 km<sup>2</sup> una altitud de 500 m.s.n.m. Presenta abundante vegetación tropical, en donde existen especies y géneros de flora y fauna como en ningún otro sector del país. La temperatura promedio es de 25°C, siendo cálido-húmedo por la presencia de la selva y la humedad es de 90 a 100%. Tena es la cabecera cantonal y

capital de la provincia, está conformada por siete parroquias: Tena (urbana) y Pano, Talag, Puerto Napo, Misahuallí, Ahuano y Chontapunta (rurales) (212).

### **3.1.2.2 Cantón Archidona**

La población es de 27.747 (213) habitantes distribuida en una superficie de 3039.2 km<sup>2</sup>. El clima es cálido húmedo, con precipitaciones que varían entre los 4.000 y 5.000 mm anuales, su altitud 577 m.s.n.m con una temperatura promedio de 24°C y una presión atmosférica de 712 mm hg. El cantón está conformado por las parroquias: Archidona (urbana) y Cotundo y San Pablo de Ushpayacu y Hatun Sumaku (rurales) (212).

### **3.1.2.3. Cantón Arosemena Tola**

La población de 4.625 (213) personas, cuenta con una extensión de 496 km<sup>2</sup> y una altitud de 500 m.s.n.m. El cantón tiene un clima que varía entre templado permanentemente húmedo (90%) en las alturas serranas a uno tropical lluvioso de la zona plana o amazónica. Cincuenta por ciento de la superficie de este cantón presenta abundante vegetación tropical, en donde existen especies y géneros de flora y fauna como en ningún otro sector del país. También se encuentran bosques primarios que cuentan con árboles madereros de excelente calidad, presencia de una gran cantidad de palmeras, plantas medicinales, orquídeas, plantas endémicas y fauna de todo género. Cuenta, además, con una sola parroquia urbana que es Carlos Julio Arosemena Tola (212).

En los cantones El Chaco y Quijos no se ha notificado la presencia de hospederos intermediarios por lo que no se tomaron en cuenta en este estudio (212).

### **3.1.3. Provincia Guayas**

La provincia cuenta con una población de 3,645.483 habitantes, con una superficie de 17.139 km<sup>2</sup>. Está dividida en 25 cantones, que a su vez están conformados por parroquias, las cuales en total suman 50 parroquias urbanas y 29 parroquias rurales (212). En esta provincia se han reportado hospederos intermediarios y definitivos infectados con *A. cantonensis* (26).

#### **3.1.3.1. Cantón Guayaquil**

La población es 2.350.915 habitantes y una extensión de 4196,37 km<sup>2</sup> posee 16 parroquias urbanas y 5 rurales. La ciudad tiene una temperatura cálida durante casi todo

el año con una temporada húmeda y otra lluviosa. En este estudio las parroquias Ximena, Tarqui, Roca, García Moreno, Urdaneta, Letamendi y Olmedo constituyeron las áreas controles, donde los médicos de atención primaria de salud no recibieron intervención educativa (grupo sin intervención) (212).

### **3.2. Diseño de estudio**

Se realizó una investigación con diseño mixto prospectivo, entre 2017 y 2019, que incluyó tres estudios:

1. Corte transversal con el objetivo de estimar la prevalencia e intensidad promedio de la infección, para lo cual se colectaron *L. fulica* en los cantones Tena, Archidona y Arosemena Tola, provincia Napo durante junio a septiembre de 2019.
2. Experimental filogenético que incluyó cinco provincias amazónicas u orientales (Orellana, Sucumbíos, Napo, Zamora y Pastaza) y en seis provincias del litoral costero (Guayas, Manabi, El oro, Los ríos, Esmeralda y Santa Elena), con el objetivo de establecer las relaciones filogenéticas entre los aislamientos del parásito de diferentes provincias del país y el resto del mundo. El estudio se realizó entre mayo de 2017 y abril de 2019.
3. Cuasi-experimental, que abarcó tres etapas: diagnóstica (para explorar los CPP de los médicos de atención primaria que laboran en las comunidades antes mencionadas); intervención educativa (para aminorar posibles insuficiencias detectadas) y, por último, la evaluación de los conocimientos adquiridos post-intervención educativa. El estudio se realizó entre noviembre de 2017 y agosto de 2018. Para establecer las comparaciones correspondientes se incluyó el grupo control (médicos que no recibieron intervención educativa).

### **3.3. Población según tipo de estudio**

El estudio de prevalencia e intensidad promedio de la infección por *A. cantonensis* en *L. fulica* se realizó en localidades de tres cantones de la provincia Napo, localizada en la región amazónica u oriental, donde previamente ha sido notificada la presencia de hospederos intermediarios infectados. La selección de Napo estuvo basada en los resultados de dos estudios exploratorios (línea base) que abarcaron dos periodos 2008-2014 y 2014-2017 que identificaron a la provincia Napo con una elevada proporción de

caracoles infectados por *A. cantonensis* (30,3%, datos INSPI no publicados y 27,20% (26). Por otra parte, ciertas costumbres culinarias de consumir hospederos intermediarios, así como la manipulación de los mismos en una comunidad que es sobretodo rural, coloca a esta población en particular en riesgo de adquirir la enfermedad (62). Además, se contó con la importante aprobación de las autoridades de salud y gobernanza para abordar los estudios en Napo.

Para el estudio de la filogenia del parásito se recolectaron *L. fulica* en cada una de las once provincias seleccionadas (cinco amazónicas u orientales en el Este y seis del litoral costero en el Oeste), en la búsqueda de larvas L3 de *A. cantonensis*, para la posterior reproducción del ciclo biológico en el laboratorio y obtención de parásitos adultos. La selección de las provincias a estudiar se basó en información previa sobre la presencia de hospederos intermediarios infectados en esas provincias (13),(26). Además, se escogieron las provincias del litoral costero y la de la región amazónica teniendo en cuenta que entre ambas zonas geográficas existe una separación geográfica natural que es la cordillera de los Andes que podría eventualmente explicar la aparición de posibles diferencias genéticas entre los aislamientos de ambas regiones.

Además, se aplicó una encuesta de CPP al universo de profesionales de atención primaria (163 médicos), sobre la angiostrongiliasis. Este personal labora en las Unidades de Salud de los cantones Tena, Archidona y Arosemena Tola de Napo, y en las siete parroquias del cantón Guayaquil de Guayas. Para atenuar las deficiencias encontradas se realizaron un grupo de acciones con los médicos de la provincia Napo y seis meses más tarde, se aplicó la misma encuesta al universo de médicos participantes en el estudio.

#### **3.4. Captura y procesamiento de *Lissachatina fulica*. Obtención de las larvas**

En el estudio con hospederos intermediarios (*L. fulica*) se recolectaron los caracoles en localidades de los cantones de Tena, Archidona y Arosemena Tola. La recolección de los ejemplares se realizó en regiones húmedas, en los alrededores de las Unidades de Salud donde trabajan los médicos a los que se les aplicó la encuesta.

La captura manual de ejemplares de los hospederos intermediarios (*L. fulica*), se realizó mediante el método de captura por unidad de esfuerzo en 15 minutos (214), en las localidades atendidas por las 14 Unidades de Salud consideradas en el estudio.

Los caracoles recolectados en el terreno se procesaron para la extracción del tejido blando mediante la aplicación del método de Lovato-Paraense modificado (215). Se separó en su totalidad la membrana paleal, la que alberga 85% de las larvas infecciosas del caracol (216), (217), la misma se colocó en placas de Petri con 2,5 mL de jugo gástrico artificial (1,6 g pepsina (Sigma-Aldrich, EUA), 500 mL de solución de HCl a 0,08%, NaCl 0,20%, pH 1,2) durante 6 horas (218).

El contenido de las placas se centrifugó (BD Clay Adams™ Dynac™ III Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 300 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Una vez obtenidas las larvas se examinaron bajo un microscopio estereoscópico Motic SMZ-168™ (MOTIC INSTRUMENTS INC, China) en busca del movimiento típico de las larvas en Q o en S (0,75x). Este rasgo de comportamiento no se ha observado en otras especies de nematodos de vida libre y, por tanto parece distintivo de *A. cantonensis* (219). Finalmente, se observaron en un microscopio Olympus CX31 TM (Olympus Corporation, Japón) para realizar la identificación taxonómica (objetivo 40X) de los nematodos basada en los parámetros morfológicos previamente estudiados (119), (120), (219), (220).

Un procedimiento similar se siguió con *L. fulica* colectadas en las diferentes provincias para el estudio de filogenia.

### **3.5. Estimación de la prevalencia e intensidad promedio de infección por *Angiostrongylus cantonensis* en *Lissachatina fulica***

Se determinó la prevalencia de infección por *A. cantonensis* en *L. fulica* según se expone a continuación (221):

$$\text{Prevalencia de infección} = \frac{\text{número de caracoles infectados con L3}}{\text{número total de caracoles colectados}} \times 100$$

Las L3 encontradas en los caracoles recolectados en las diferentes localidades de los cantones en estudio se cuantificaron con el propósito de estimar la intensidad de la infección con la aplicación del siguiente cálculo (222), (223):

$$\text{Intensidad promedio de infección} = \frac{\text{número total de L3 en caracoles por localidad}}{\text{número total de caracoles infectados}} \text{ por localidad}$$

### **3.6. Infección experimental de ratas**

En el estudio de filogenia se utilizó el ADN obtenido de parásitos adultos, tal como se ha reportado en estudios previos (187), (188), (224), (225), (226), (227). Para tal efecto, las L3 obtenidas de *L. fulica* recolectados en las once provincias se utilizaron para infectar experimentalmente ratas hembra adultas *R. norvegicus*, cepa Wistar con 12 semanas y  $200 \pm 2$  g de peso corporal. Las ratas fueron suministradas por el Bioterio del INSPI, con sus correspondientes certificados sanitarios y de calidad genética. Este procedimiento se realizó con el fin de reproducir el ciclo de vida del parásito en el Centro Nacional de Referencia de Parasitología. Se administraron por vía oral, con auxilio de una pipeta, un promedio de 150 L3 (contadas en cámara de Neubauer) a cada una de las ratas. Las ratas infectadas se separaron en jaulas individuales (dos especímenes por jaula) y se identificaron según el lugar de origen (provincia) de donde fueron recolectadas *L. fulica* infectadas.

El manejo de los animales se realizó de acuerdo con la guía para el mantenimiento y uso de animales de experimentación del laboratorio, siguiendo la Legislación sobre la protección de animales utilizados con fines científicos Directiva 2010/63/UE modificada por Reglamento de la Unión Europea (UE) 2019/1010 (228). Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24°C) y humedad (60,0%), ciclo alternativo de luz/oscuridad de 12 horas, y recibieron alimentación y agua a pH de 7,0, *ad libitum*.

Una vez transcurrido el tiempo promedio de duración del ciclo de vida del parásito desde su estado larval hasta llegar a adulto (32-35 días), se examinó la cavidad torácica de cada rata (corazón, arterias pulmonares y pulmones) en busca de nematodos parásitos, juveniles o adultos, según protocolos previamente establecidos en el INSPI (13). La morfología de la bursa y el tamaño de las espículas caudales se utilizaron como características taxonómicas para la identificación de los parásitos. Los nematodos adultos de las dos ratas infectadas con especímenes que representan cada provincia se guardaron en un único recipiente en alcohol a -90° C y fueron debidamente identificados.

### 3.7. Análisis molecular y filogenético

#### 3.7.1. Obtención de ADN genómico

Los parásitos adultos encontrados en las dos ratas que representan cada provincia se cortaron con un bisturí en pedazos diminutos y se maceraron en solución salina (0,9% de NaCl). El ADN se extrajo utilizando el juego de reactivos QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Holanda), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN extraído se identificó según su origen, se almacenó en alícuotas de 50 µL a -80°C hasta su posterior amplificación mediante la técnica de la PCR. La concentración de ADN se midió directamente en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, ThermoScientific, EUA).

#### 3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Al ADN extraído de aproximadamente 40 a 50 parásitos adultos se les realizó la PCR para amplificar el gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad 1 (185). La PCR se realizó en un volumen total de 25 µL que contenía 12,5 µL de GoTaq® colorless mastermix (DNA polimerasa 2x, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP) y 3mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,5); 1,5 µL de 10 µM de cada cebador (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA) previamente reportados para el marcador genético seleccionado (185); 5,5 µL de agua destilada y 4 µL de ADN genómico. Se utilizó un control positivo que consistió en ADN (extraído el 6/03/2017) de parásitos adultos obtenidos de una rata silvestre (*Rattus rattus*) y un control negativo con agua ultrapura.

Los cebadores utilizados fueron:

*co1-F* (5'TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG3')

*co1-R* (3'TTTTTTGGCATTTCCTGAGGT5')

La PCR se efectuó utilizando un termociclador de la marca Bio-Rad (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA).

Se realizaron modificaciones al protocolo original descrito por Apichat y colaboradores (185), con el fin de estandarizar la técnica en el laboratorio del INSPI y obtener el fragmento amplificado deseado de un peso de 450 pares de bases, quedando el protocolo de la siguiente manera:

Gen *co1*: 94°C durante 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos; con una extensión final a 72°C durante 5 minutos (185).

El tamaño del amplicon para el gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad 1 es de 450 pb (185).

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega, EUA) 1,2% en tampón de corrida Tris-acetato de 0,04 M, ácido etilendiamino tetraacético 1Mm, pH 8,0. (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA). Brevemente, se añadieron al gel de agarosa 10 µl de colorante Syber® 1x (10000 x) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA). Como tampón de carga, se utilizó Blue/Orange Loading Dye, 6x (Promega, EUA), y como marcador de peso molecular TrackIt™ 100 pb (0,1 µg/µL) con un rango de 100 a 1000 pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA). La corrida electroforética se realizó a 80 V durante 55 minutos con la fuente Bio-Rad (Bio-Rad PowerPac™ HC, EUA). Los productos se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad, EUA).

### **3.7.3. Purificación de los productos de la PCR y secuenciación**

La purificación de los productos de la PCR y la secuenciación de las cadenas de nucleótidos correspondientes a los productos amplificados a partir del gen que codifica la *co1*, se realizaron por el servicio de bioquímica de la Universidad de las Américas (Ecuador). Para este último proceso, se emplearon los mismos cebadores utilizados en la reacción de amplificación. Para la secuenciación de Sanger se utilizó un analizador genético Applied Biosystems® 3130 (EUA).

Los electroferogramas resultantes se editaron con el programa Geneious 7.0 (BIOMATTERS®, Australia). A partir de las secuencias sentido y antisentido de cada muestra amplificada y secuenciada, se construyeron las secuencias consenso o CONTIGS (229). Las secuencias consenso fueron depositadas en el Banco de Genes.

### **3.7.4. Estudios de filogenia**

Las secuencias ensambladas se alinearon con las de referencia que representan los clados ac1 a ac16 utilizando el algoritmo MUSCLE del programa MEGA10 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis versión X, ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (230). La

reconstrucción filogenética se realizó mediante los métodos de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood) (225), Unión al Vecino (Neighbour Joining,) (226) y Máxima Parsimonia (Maximun Parsimony) (231), con la utilización de un modelo evolutivo HKY (232) recomendado por el programa, con una tasa de distribución gamma y un *bootstrap* de 1000 réplicas, con un punto de corte de 50% (233). Se consideró como grupo externo las secuencias *Angiostrongylus vasorum* número de espécimen D28a citocromo oxidasa subunidad 1 (número de acceso al banco de genes GQ982) y *Angiostrongylus costaricensis* número de espécimen 6971 *co* 1 (número de acceso al banco de genes GI138116).

### **3.8. Conocimientos, percepciones y práctica sobre la angiostrongiliasis de médicos de atención primaria de la provincia Napo, antes y después de una intervención educativa**

Se trata de un estudio cuasiexperimental para explorar las posibles insuficiencias cognoscitivas, perceptuales y conductuales en relación con el diagnóstico, tratamiento y control de la angiostrongiliasis, mediante la aplicación de una encuesta de CPP (Anexo 1), posteriormente, se realizó la intervención educativa para atenuar posibles insuficiencias y, por último, se evaluaron los conocimientos adquiridos post-intervención educativa.

#### **3.8.1. Universo de estudio**

Fueron convocados al estudio el universo de médicos de atención primaria, para un total de 163 galenos: 66 médicos que prestan servicios en las Unidades de Salud de tres cantones de la provincias Napo (Tena, Archidona y Arosemena Tola) y en las Unidades de Salud (97 médicos) de las siete parroquias del cantón Guayaquil de la provincia Guayas. Estos últimos, constituyen el grupo sin intervención educativa.

#### **3.8.2. Criterios de inclusión y exclusión**

Se incluyeron los médicos con nombramiento que trabajaban en Unidades de Salud de atención primaria, y que de forma voluntaria expresada en la firma del consentimiento informado estuvieron de acuerdo en participar en el estudio. Se excluyeron los médicos especialistas y los que se encontraban en servicio rural.

### **3.8.3. Etapas de estudio**

#### **3.8.3.1. Diagnóstica**

Esta etapa incluyó desde la preparación y validación del cuestionario hasta la aplicación de la encuesta.

##### **3.8.3.1.1. Preparación del cuestionario**

Con el objetivo de elaborar un cuestionario se realizaron entrevistas abiertas a un grupo de médicos de atención primaria, que no formarían parte de los grupos de estudio. El mismo quedó conformado por los siguientes temas: generalidades (3 preguntas), ciclo de vida (6 preguntas), manifestaciones clínicas (4 preguntas), diagnóstico (4 preguntas), tratamiento (2 preguntas), prevención (2 preguntas), percepción (2 preguntas) y práctica del entrevistado en relación a la enfermedad (2 preguntas) para un total de ocho temas y 25 preguntas.

##### **3.8.3.1.2. Validación del cuestionario**

La propuesta de cuestionario a utilizar, se consultó con expertos del Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"(IPK). La factibilidad del empleo del cuestionario preliminar se ensayó mediante un estudio de validación que se aplicó a nueve médicos especialistas en infectología. Para ello, cada uno de los médicos evaluó las 25 preguntas utilizando la escala de Likert de 1 a 5 (que va desde total desacuerdo-hasta muy de acuerdo (234), con el fin de medir el nivel de acuerdo o desacuerdo de los profesionales con las preguntas de la encuesta. Posteriormente, se calculó el coeficiente alfa de Cronbach para medir la fiabilidad de la escala. Para el presente estudio, se consideraron apropiados valores de alfa de Cronbach por encima de 0,8 según criterios previamente establecidos (235). El proceso de validación arrojó como resultado un coeficiente de Cronbach de 0,962; por lo que el cuestionario se consideró aceptable para su aplicación a los médicos de atención primaria participantes. Este cuestionario sirvió para el establecimiento de una línea base y para la evaluación de una intervención dirigida a disminuir las deficiencias encontradas con la primera aplicación de la encuesta.

### 3.8.3.1.3 Aplicación de la encuesta

La encuesta definitiva se aplicó, por el responsable de la investigación, al universo de médicos de atención primaria, 163 médicos en total, entre los meses de noviembre-diciembre de 2017.

### **3.8.3.2. Intervención para atenuar el problema**

Los médicos se separaron en dos grupos: el grupo con intervención (integrado por 64 médicos de atención primaria de los catorces Unidades de Salud de los tres cantones de la provincia Napo) y el grupo sin intervención (conformado por 92 médicos de las siete parroquias del cantón Guayaquil de la provincia Guayas a los que no se les realizó intervención).

#### 3.8.3.2.1. Componentes de la intervención

La intervención consistió en un ciclo de cinco conferencias de actualización sobre generalidades del parásito, epidemiología, manifestaciones clínicas, diagnóstico, tratamiento y medidas de prevención y control de la angiostrongiliasis, que incluyó discusiones de casos. Además, se preparó y distribuyó un manual titulado “Angiostrongiliasis. Biología, clínica, diagnóstico y tratamiento,” a todos los médicos de forma gratuita. Para la preparación de este manual se revisaron, con el auxilio de diferentes buscadores electrónicos, los artículos sobre angiostrongiliasis o relacionadas con esta parasitosis, publicados durante el periodo 2000-2018.

La forma de organización de la enseñanza: consistió en conferencias (12 horas), clase práctica (4 horas) y estudio independiente (4 horas). La evaluación final 4 horas. A cada participante se le entregó una carpeta digital con artículos actualizados sobre el tema objeto de estudio.

### **3.8.3.3. Evaluación de los conocimientos adquiridos post-intervención**

Seis meses después de finalizada la intervención educativa se aplicó la misma encuesta a los médicos de ambos grupos de estudio, lo cual permitió evaluar si los médicos entrenados habían asimilado o no los conocimientos teóricos impartidos.

### 3.9. Análisis de los resultados

Para dar salida al objetivo 1: Estimar la prevalencia e intensidad promedio de infección por *A. cantonensis* en *L. fulica* de tres cantones de la provincia Napo, República del Ecuador. Se revisaron los datos obtenidos en el trabajo de campo, que incluyeron el número de hospederos intermediarios recolectados (infectados y no infectados). Se calculó la prevalencia de infección por L3 de *A. cantonensis* en *L. fulica*, así como la intensidad de la infección.

Para dar salida al objetivo 2: Establecer las relaciones filogenéticas entre los aislamientos del parásito de diferentes provincias del país. A partir de las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada muestra, alineadas con otras secuencias de otras partes del mundo previamente publicadas en el banco de genes, se construyeron los árboles filogenéticos. Se procedió según lo descrito en el acápite 3.7.4. y apoyados en el programa MEGA, para la construcción del árbol filogenético.

Para dar salida al objetivo 3: Evaluar los conocimientos sobre angiostrongiliasis en médicos de atención primaria de tres cantones de la provincia Napo, República del Ecuador, antes y después de la intervención educativa. Se confeccionó una base de datos en Access 2016 para introducir los resultados de las encuestas y almacenar toda la información necesaria, con doble entrada de datos, para el posterior análisis exhaustivo de la información recolectada. Los datos discordantes se rectificaron solamente por los investigadores a partir de los registros originales. Se tomaron las precauciones adecuadas para que cualquier corrección que hubiese que realizar no introdujera confusión lo que garantiza la validez interna del estudio. Posteriormente, se realizó el análisis de la información con el software estadístico IBM, SPSS, versión 25 (236).

Se compararon las medias de respuestas correctas de los médicos incluidos en los siguientes grupos: grupo con intervención y sin intervención (primera aplicación de la encuesta, grupo con intervención y sin intervención (segunda aplicación de la encuesta), grupo con intervención (primera y segunda aplicación de la encuesta) y grupo sin intervención, (primera y segunda aplicación de la encuesta). Para ello se aplicó el estadístico *t-Student*.

Se realizó la prueba de comparación de proporciones de las respuestas correctas a cada pregunta antes y después de la intervención, para lo cual se utilizó la prueba Chi-

cuadrado de McNemar. Se consideró diferencias estadísticamente significativas para los valores de  $P < 0,05$ .

### **3.10. Clasificación de variables**

Acerca de lo que el profesional encuestado conoce, percibe y práctica en relación con la angiostrongiliasis. Para todas las variables del cuestionario, se calculó el número y porcentaje de respuestas correctas.

#### **Tema generalidades**

- **Etiología de angiostrongilosis**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: bacteriana; viral; parasitaria; micótica y no es una enfermedad infecciosa.
- **Países o áreas geográficas más afectadas**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: países del continente africano; países del continente europeo; predomina en sureste asiático; países del continente americano y esta enfermedad predomina en cualquier lugar del mundo.
- **Vía de transmisión**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: ingestión de carnes crudas; ingestión de aguas contaminadas; por transfusiones de sangre; ingestión de moluscos y caracoles crudos y por relaciones sexuales sin protección.

#### **Tema ciclo de vida**

- **Hospederos definitivos habituales**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: caracoles y moluscos de agua dulce; ratas y otros roedores; seres humanos; perros, gatos y otros animales mamíferos y peces y langostinos de agua dulce.
- **Hospederos intermediarios habituales**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: diferentes especies de plantas acuáticas; seres humanos; ratas y otros roedores; perros, gatos y otros mamíferos y diferentes tipos de moluscos y caracoles.
- **Localización del parásito adulto**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: pulmones de la rata y otros roedores; pulmones de los seres humanos; intestinos de los seres humanos; cerebro de los seres humanos y en ninguna de las localizaciones anteriores.

- **Localización del parásito en su forma larvaria**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: pulmones de la rata y otros roedores; pulmones de los seres humanos; intestinos de los seres humanos; cerebro de los seres humanos y en ninguna de las localizaciones anteriores.
- **Hospederos accidentales**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: ratas y otros roedores; peces y langostinos de agua dulce; el hombre y otros mamíferos; caracoles y moluscos de agua dulce y diferentes especies de plantas acuáticas.
- **Forma infectante del parásito**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: L1 que se encuentran en los hospederos definitivos; larvas L3 que se encuentran en el tejido de los hospederos intermediarios; larvas L5 que se encuentran en el hospedero definitivo y en el hospedero accidental; huevos de *A. cantonensis* en el hospedero definitivo y ninguna de las anteriores.

#### **Tema clínica**

- **Manifestaciones clínicas**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: meningitis, encefalitis y lesiones oculares con marcada eosinofilia; no se presentan manifestaciones oculares; los casos que se presentan con encefalitis son muy frecuentes y siempre son fatales; la toma pulmonar es muy frecuente y produce síndrome de Loeffler y los planteamientos anteriores son posibles.
- **Periodo de incubación**, Variable independiente, cualitativa nominal con cinco categorías: de 3 a 6 meses; de 6 meses a 1 año; de 1 a 3 semanas; de 1 a 3 días y menor a 24 horas.
- **Infección parasitaria**, Variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: se resuelven espontáneamente sin tratamiento específico; se convierte en una infección crónica que dura años; se convierte en una infección sistémica con compromiso multiorgánico; produce tumoraciones en el parénquima cerebral y ninguna de las anteriores.
- **Duración de la enfermedad**, Variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: 1 semana; 2 a 8 semanas; 8-12 meses; 3-7 días y ninguna de las anteriores.

### **Tema diagnóstico**

- **Diagnóstico en Ecuador**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: visualización del agente etiológico en muestras de sangre, orina y heces; a través de la sintomatología clínica y antecedentes epidemiológicos; presencia de larvas de *A. cantonensis* en muestras de saliva; presencia de larvas de *A. cantonensis* en biopsias de piel y ninguno de los planteamientos anteriores es correcto.
- **Hallazgo de laboratorio**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: cifras de hemoglobina notablemente disminuidas; aumento significativo de las transaminasas hepáticas; disminución de los niveles de glucosa en sangre; presencia de más de 10% de eosinófilos en el LCR y presencia abundantes plaquetas en el frotis de sangre periférica.
- **Métodos de diagnóstico indirecto**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cuatro categorías: métodos de ELISA e inmunotransferencia tienen una sensibilidad media y baja especificidad; Tomografía Axial computarizada no tiene mucha utilidad; ecografía permite el diagnóstico y ninguno de los planteamientos anteriores son correctos.
- **Hallazgo de larvas en líquido cefalorraquídeo**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: 50-60% de los casos; 80-60% de los casos; 1% de los casos; nunca se encuentra en LCR y ninguna de las anteriores.

### **Tema tratamiento**

- **Tratamiento médico**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: uso de corticosteroides como terapia única y/o albendazol o mebendazol; extracción quirúrgica del parásito; ivermectina, dosis única; se recomienda el uso de prednisolona por vía oral durante 12 meses; la mejor opción es utilizar antibióticos de amplio espectro durante 7 días; todos los planteamientos anteriores son correctos.
- **Tratamiento ante daño ocular**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: remoción quirúrgica del parásito intraocular; terapia con láser retinal; esteroides tópicos; esteroides sistémicos acompañados de albendazol o mebendazol y tratamiento sistémico solo con antihelmínticos en dosis elevadas.

### **Tema prevención**

- **Medidas profilácticas**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: hervir el agua de consumo humano; cocción adecuada de caracoles o moluscos antes de ser ingeridos; disposición adecuada de residuos líquidos y sólidos en las comunidades; examen adecuado de las donaciones de sangre antes de ser utilizadas y todas las medidas anteriores son adecuadas para evitar contraer esta enfermedad.
- **Otras medidas**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: uso de vacunas; uso de antihelmínticos, exámenes de heces periódicos, detección de anticuerpos en el suero y ninguna de las anteriores.

### **Tema percepción**

- **Frecuencia de la enfermedad en Ecuador**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con tres categorías: es una causa muy frecuente de enfermedad; es una causa poco frecuente de enfermedad y nunca se han presentado casos de enfermedad producida por este parásito.
- **Formación de pregrado sobre la temática**, Variable independiente, cualitativa nominal politómica con tres categorías: fueron suficientes; fueron insuficientes y no se les proporciono ninguna información sobre las enfermedades que produce.

### **Tema práctica**

- **Conducta a seguir ante situación problemática uno**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con tres categorías: da tratamiento sintomático y lo envía a su casa; da una hoja de interconsulta para que vaya al hospital el día lunes al gastroenterólogo y lo envía inmediatamente al hospital más cercano.
- **Complementarios ante situación problemática dos**, variable independiente, cualitativa nominal politómica con cinco categorías: búsqueda del parásito en LCR y conteo de eosinófilos, además de conteo de eosinófilos en sangre; examen de gota gruesa y frotis de sangre periférica, búsqueda del parásito en las deposiciones, hemocultivo y cultivo de orina.

### **3.11. Control de sesgos**

En cuanto a la selección de los individuos participantes se insistió en el uso correcto de los criterios de inclusión y exclusión expuestos en el acápite 3.8.2.

Se creó una base de datos que identificó a cada uno de los encuestados con un número, además de las iniciales del nombre. Toda la información generada se ingresó por el personal autorizado para tales fines, a doble entrada para evitar sesgo de introducción de datos e información faltante.

### **3.12. Aspectos éticos**

El protocolo fue aprobado por la Comisión de Ética de Investigaciones en seres Humanos (CEISH) de la Clínica Kennedy de la Ciudad de Guayaquil, aprobado por el Ministerio de Salud de Ecuador, código único de aprobación DIS-CEISH-HCK-09-014. La investigación que se propuso no entraña riesgos para el medio ambiente ni para los participantes en la misma.

A todos los médicos de atención primaria de las localidades de estudio que cumplieran con los criterios de inclusión antes referidos se les extendió un modelo de consentimiento informado (Anexo 2) con el propósito de que dejarán constancia escrita de su conformidad.

Durante el tiempo que duró el estudio los miembros del equipo de investigación garantizaron que los participantes recibieran la información que solicitasen.

Para garantizar la confidencialidad o privacidad de los datos de los encuestados, el equipo de investigación manejó la información con estricta confidencialidad. Solo los investigadores responsables tuvieron acceso a la base de datos. Además, se informó que los participantes en el estudio podían abandonar la investigación en cualquier momento sin que esto implicara sanción alguna.

Los investigadores no declararon conflictos de intereses.

# **RESULTADOS**

## IV. RESULTADOS

### **4.1. Prevalencia e intensidad promedio de infección por *A. cantonensis* en *Lissachatina fulica* de tres cantones de Napo, República del Ecuador**

En las catorce localidades estudiadas de los tres cantones de la provincia Napo se recolectaron 1 476 *L. fulica*, encontrándose 687 infectados con L3 de *A. cantonensis*, lo que corresponde a 46,54% de infección. En el total de *L. fulica* infectadas se encontraron 2 236 larvas, es decir, 3,25 larvas por cada caracol infectado. En las localidades, alrededores HJMVI, Muyuna, Misahuallí, Archidona, Arosemena Tola, Puerto Napo, Satelital Tena se encontró una prevalencia promedio de *L. fulica* infectadas por localidad superior a la prevalencia promedio de infección total, destacándose Archidona y Arosemena Tola con una mayor intensidad de infección. Si se analiza por cantón la mayor prevalencia se obtuvo en Arosenema Tola (70,0%), seguido de Archidona con 54,0% y de Tena con 44,12%, mientras que la mayor intensidad de infección se obtuvo en el cantón Archidona (5,03), seguido de Arosenema Tola (4,90) y por último, Tena (2,87) (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia e intensidad promedio de infección por *Angiostrongylus cantonensis* en *Lissachatina fulica* de localidades de tres cantones de Napo, República del Ecuador, 2019.

| Cantones              | Localidades estudiadas | Caracoles colectados (#) | Caracoles infectados (#) | Prevalencia (%) | Larvas L3 (#) | Intensidad promedio de infección por localidad | Prevalencia (%) / intensidad promedio de infección por cantón |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|---------------|--|---|
| <b>Tena</b>           | Alrededores HJMVI      | 100                      | 54                       | 54,0            | 80            | 1,48   | 44,12/2,87  |
|                       | Casa del Diabético     | 100                      | 45                       | 45,0            | 60            | 1,33   |   |
|                       | Pano                   | 100                      | 30                       | 30,0            | 90            | 3,0  |   |
|                       | Muyuna                 | 100                      | 55                       | 55,0            | 176           | 3,18   |   |
|                       | Ahuano                 | 120                      | 59                       | 49,20           | 212           | 3,59   |   |
|                       | Misahualí              | 100                      | 60                       | 60,0            | 168           | 2,80   |   |
|                       | Talag                  | 135                      | 24                       | 17,77           | 110           | 4,58   |   |
|                       | Shandia                | 121                      | 44                       | 36,36           | 150           | 3,40   |   |
|                       | Paushiyacu             | 100                      | 42                       | 42,0            | 197           | 4,69   |   |
|                       | Urbano Tena            | 100                      | 23                       | 23,0            | 70            | 3,04   |   |
|                       | Puerto Napo            | 100                      | 66                       | 66,0            | 125           | 1,89   |   |
|                       | Satelital Tena         | 100                      | 61                       | 61,0            | 183           | 3,00   |   |
| <b>Archidona</b>      | Archidona              | 100                      | 54                       | 54,0            | 272           | 5,03   | 54,0/5,03   |
| <b>Arosemena tola</b> | Arosemena Tola         | 100                      | 70                       | 70,0            | 343           | 4,90   | 70,0/4,90   |
|                       | <b>Total</b>           | <b>1476</b>              | <b>687</b>               | <b>46,54</b>    | <b>2236</b>   | <b>3,25</b>                                    |   |

HJMVI: Hospital José M. Velasco Ibarra.

Fuente: Registros del laboratorio de Parasitología, INSPI

#### 4.2. Infección experimental de ratas con L3 de *Angiostrongylus cantonensis*. Análisis filogenético de parásitos adultos utilizando el gen *citocromo oxidasa* subunidad 1

Previamente y con el fin de reproducir en ratas el ciclo de *A. cantonensis* para obtener parásitos adultos y realizar los estudios de filogenia, se recolectaron *L. fulica* infectadas en once provincias de la República del Ecuador.

Con las L3 de *A. cantonensis* obtenidas de *A. fulica* se infectaron ratas y en 100% de estas se obtuvieron parásitos adultos. Se recuperaron entre 20 y 25 adultos de cada rata infectada con 150 L3.

A partir del ADN de los parásitos adultos, se obtuvieron los amplicones esperados (459 pb), mediante la amplificación del gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad 1, como se muestra en la figura 7. Los productos de la PCR se secuenciaron y las secuencias nucleotídicas correspondientes a los especímenes colectados en las once provincias se informaron al banco de genes y sus números de accesos aparecen en el anexo 3.

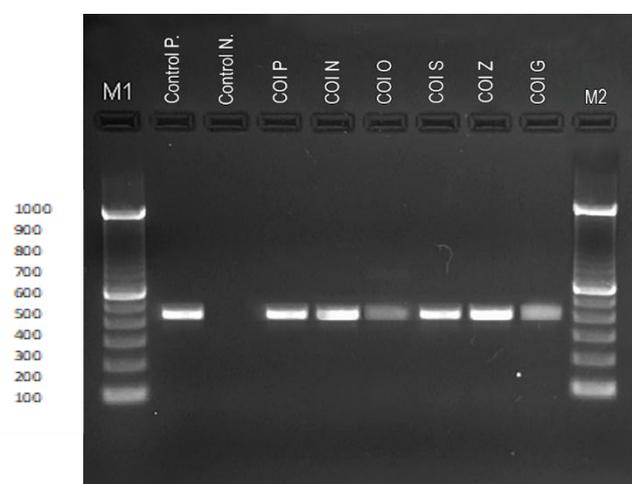


Figura 7. Resultados de la PCR a partir del ADN de parásitos adultos.

M1 y M2: Marcadores de peso molecular: TrackIt™ 100 pb (0,1 µg / µL) con un rango de 100 a 1000 pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA); Control positivo, control negativo, COIP, COIN, COIO, COIS, COIZ, COIG. Productos de la amplificación que corresponden a seis de las provincias estudiadas. Se observan las bandas correspondientes a los amplicones (459 pb) obtenidos a partir del ADN de parásitos adultos.

En la tabla 2 se muestra una matriz que refleja la alta similaridad entre las secuencias de los aislamientos ecuatorianos (entre 98,6 y 100 %).

Tabla 2. Matriz de similitud de secuencias nucleotídicas del fragmento de gen *co 1* de los aislamientos ecuatorianos.

|             | Los Rios | Santa Elena | El Oro | Zamora | Pastaza | Orellana | Napo | Esmeraldas | Manabi | Guayas | Sucumbios |
|-------------|----------|-------------|--------|--------|---------|----------|------|------------|--------|--------|-----------|
| Los Rios    |          | 99          | 99     | 99     | 99      | 99       | 99   | 99         | 99     | 99     | 98,6      |
| Santa Elena | 99       |             | 100    | 100    | 100     | 100      | 100  | 100        | 100    | 100    | 99,6      |
| El Oro      | 99       | 100         |        | 100    | 100     | 100      | 100  | 100        | 100    | 100    | 99,6      |
| Zamora      | 99       | 100         | 100    |        | 100     | 100      | 100  | 100        | 100    | 100    | 99,6      |
| Pastaza     | 99       | 100         | 100    | 100    |         | 100      | 100  | 100        | 100    | 100    | 99,6      |
| Orellana    | 99       | 100         | 100    | 100    | 100     |          | 100  | 100        | 100    | 100    | 99,6      |
| Napo        | 99       | 100         | 100    | 100    | 100     | 100      |      | 100        | 100    | 100    | 99,6      |
| Esmeraldas  | 99       | 100         | 100    | 100    | 100     | 100      | 100  |            | 100    | 100    | 99,6      |
| Manabi      | 99       | 100         | 100    | 100    | 100     | 100      | 100  | 100        |        | 100    | 99,6      |
| Guayas      | 99       | 100         | 100    | 100    | 100     | 100      | 100  | 100        | 100    |        | 99,6      |
| Sucumbios   | 98,6     | 99,6        | 99,6   | 99,6   | 99,6    | 99,6     | 99,6 | 99,6       | 99,6   | 99,6   |           |

Las relaciones filogenéticas entre los parásitos de la provincia Napo y del resto de las provincias estudiadas se analizaron en base a la información obtenida de las secuencias parciales del gen que codifica la *co1*, en comparación con las 45 secuencias notificadas en el banco de genes de otras partes del mundo (Anexo 4) que corresponden a los 16 haplotipos descritos para el gen *co1*. No se encontró variabilidad genética entre los aislamientos del parásito procedentes de la República del Ecuador. Se confirmó que todos los aislamientos ecuatorianos corresponden a *A. cantonensis* y que las 11 secuencias de origen ecuatoriano junto a una secuencia aislada en Louisiana (EUA) se agrupan en un clado diferente a los aislados de otras regiones del mundo, lo que determina la existencia de un nuevo, que se asemeja a los haplotipos ac5 de Brasil y Japón y ac 8 de Brasil (Figura 8).

Los grupos conformados se verificaron también en árboles construidos por los métodos de Unión al Vecino y Máxima Parsimonia.

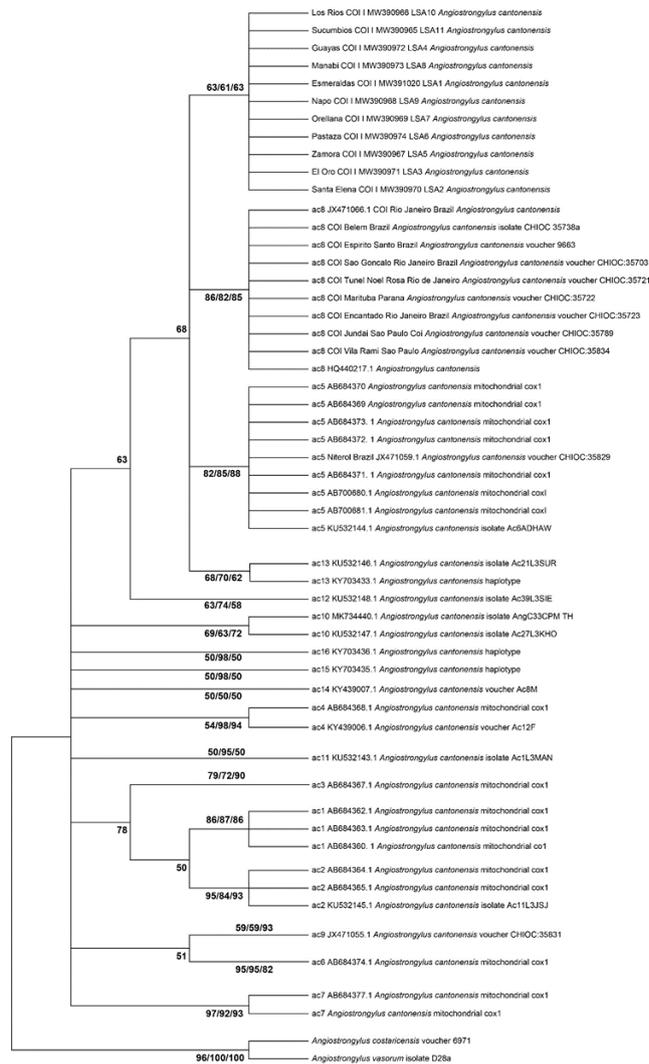


Figura 8. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad 1 de aislados de *A. cantonensis* de origen ecuatoriano (Anexo 3) y de otras secuencias notificadas en otras partes del mundo (Anexo 4).

La reconstrucción filogenética se realizó utilizando el método de Máxima Verosimilitud con un modelo evolutivo HKY, una tasa de distribución gamma y un *bootstrap* de 1000 réplicas, considerando un punto de corte de 50%. Los valores de *bootstrap* (de izquierda a derecha) que aparecen sobre las ramas corresponden a los métodos de Máxima Verosimilitud, Unión al Vecino y Máxima Parsimonia, respectivamente.

### 4.3. Conocimientos, percepciones y práctica de médicos de atención primaria sobre angiostrongiliasis de tres cantones de la provincia Napo, antes y después de una intervención educativa

#### 4.3.1 Evaluación de los resultados de la aplicación de la encuesta (etapa diagnóstica).

A continuación, se presentan los resultados de la aplicación de la encuesta al universo de médicos de atención primaria (163 médicos) de tres cantones de la provincia Napo y de siete parroquias de cantón Guayaquil de la provincia Guayas (estos últimos, con posterioridad, constituyen el grupo control o sin intervención).

#### Respuesta sobre aspectos cognoscitivos

La tabla 3 muestra el porcentaje de médicos con respuestas correctas a las preguntas relacionadas con los aspectos cognoscitivos sobre la angiostrongiliasis humana. Para la mayoría de los temas evaluados, el porcentaje de respuestas correctas se mantuvo por debajo de 50 % con excepción de generalidades y el diagnóstico.

Tabla 3. Porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas a preguntas que indagaban en aspectos cognoscitivos sobre angiostrongiliasis humana, República del Ecuador, 2017-2018.

| TEMAS         | Porcentaje de médicos encuestados con respuesta correcta (%) (n=163) |
|---------------|--|
| Generalidades | 69,12  |
| Ciclo de vida | 37,01  |
| Clínica       | 44,94  |
| Diagnóstico   | 58,13  |
| Tratamiento   | 33,44  |
| Prevención    | 33,74  |

Fuente: Cuestionario del estudio.

Para una mejor comprensión de los temas, estos se han dividido por aspectos:

#### Generalidades

- ✓ Del total, 96,32% (157/163) de los médicos encuestados conocían que la angiostrongiliasis es una enfermedad de etiología parasitaria.

- ✓ Apenas 24,54% (40/163) de los encuestados consideraron correctamente que el parásito, con frecuencia, se localiza geográficamente en el sureste asiático.
- ✓ De los participantes, 86,50% (141/163) opinaron adecuadamente que la vía de transmisión por la que se adquiere la enfermedad es por la ingestión de moluscos y caracoles crudos.

#### Ciclo de vida

- ✓ Del total, 37,42 % (61/163) de los participantes consideraron correctamente que los hospederos definitivos habituales son las ratas y otros roedores.
- ✓ Menos de la mitad de los encuestados, 42,33% (69/163) conocían que los hospederos intermedios habituales son diferentes tipos de moluscos y caracoles.
- ✓ Apenas 22,70% (37/163) de los profesionales señalaron correctamente que la localización preferente del parásito en su forma adulta es en pulmones de ratas y otros roedores.
- ✓ Únicamente 14,72% (24/163) de los encuestados, conocían que *A. cantonensis* en su forma larvaria se localiza preferentemente en el cerebro de humanos.
- ✓ Del total de encuestados, 63,19% (103/163) identificaron que el hombre y otros mamíferos son hospederos accidentales.
- ✓ Del total de médicos participantes, 41,72% (68/163) conocían que las larvas L3 es la forma infectante del parásito para el hombre.

#### Clínica

De los participantes, 61,35% (100/163) conocían que las manifestaciones clínicas más características son meningitis, encefalitis y lesiones oculares con marcada eosinofilia.

- ✓ Menos de la mitad de los encuestados, 47,85% (78/163) respondió correctamente que la enfermedad tiene un periodo de incubación de 1 a 3 semanas.
- ✓ De los encuestados, 52,15% (85/163) consideraron que la mayor parte de las infecciones producida por *A. cantonensis* se resuelven espontáneamente, sin tratamiento específico.
- ✓ Apenas 18,40% (30/163) de los participantes señalaron que la enfermedad usualmente tiene una duración de 2 a 8 semanas.

### Diagnóstico

- ✓ De los encuestados, 90,80% (148/163) conocían que el diagnóstico de la angiostrongiliasis en Ecuador se basa fundamentalmente en la sintomatología clínica y en los antecedentes epidemiológicos.
- ✓ Del total, 83,44% (136/163) consideraron correctamente que la eosinofilia de más de 10 % en el LCR es el hallazgo de laboratorio más significativo en pacientes con angiostrongiliasis.
- ✓ Solo 35,58% (58/163) de los encuestados opinaron que los métodos de ELISA e inmunotransferencia tienen sensibilidad media y baja especificidad.
- ✓ Únicamente 22,70% (37/163) respondieron adecuadamente que solo en 1% de los casos es posible hallar larvas de *A. cantonensis* en el LCR.

### Tratamiento

- ✓ Tan solo 17,79% (29/163) de los encuestados opinaron que la conducta más efectiva para el tratamiento de la angiostrongiliasis es el uso de corticosteroides como terapia única y/o albendazol o mebendazol.
- ✓ De los participantes, 49,08% (80/163) conocían que la mejor opción de tratamiento en los pacientes que presenten daño ocular es la remoción quirúrgica del parásito intraocular.

### Prevención

- ✓ Ante la pregunta de cuál es la mejor medida preventiva para evitar contraer la enfermedad, 40,49% (66/163) señalaron adecuadamente que la cocción apropiada de caracoles o moluscos antes de ser ingeridos es el aspecto de prevención que más se debe considerar.
- ✓ Sin embargo, sólo 26,99% (44/163) de los encuestados respondieron correctamente que ninguna otra de las medidas profilácticas mencionadas, como uso de vacunas, uso de antihelmínticos, exámenes de heces periódicos, y detección de anticuerpos en el suero, podían prevenir la infección.

### Respuestas sobre aspectos de percepción

- ✓ De los médicos encuestados, 52,76% (86/163) consideraron que la angiostrongiliasis es una causa poco frecuente de enfermedad.
- ✓ Del total de encuestados, 26,99% (44/163) piensan que los conocimientos recibidos sobre la enfermedad en las universidades fueron suficientes.

### Respuestas sobre aspectos relacionados con la práctica

- ✓ De los encuestados, 92,64% (151/163) conocían que la conducta a seguir ante la presencia de signos y síntomas neurológicos y antecedentes de ingestión de caracoles es la búsqueda de atención hospitalaria lo más pronto posible.
- ✓ Del total, 73,01% (119/163) respondió correctamente que la búsqueda del parásito, el conteo de eosinófilos en el LCR y en sangre son los exámenes de laboratorio idóneos para confirmar el diagnóstico.

#### 4.3.2. Intervención educativa

Con la aplicación de la encuesta CPP (línea base), previo a la realización de este estudio de intervención, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0,115$ ) en la media de respuestas correctas de los médicos que recibirían intervención (provincia Napo) y los que no la recibirían (provincia Guayas), respecto a las preguntas relacionadas con los aspectos cognoscitivos de la angiostrongiliasis (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de la media de respuestas correctas de los médicos antes de la intervención educativa según grupo con intervención y sin intervención, República del Ecuador, 2017-2018.

| Tiempo                        | Grupos           | Número | Media de las respuestas correctas | Desviación estándar | <i>P</i> (valor) |
|-------------------------------|------------------|--------|-----------------------------------|---------------------|------------------|
| Antes de la fase intervención | Con intervención | 66     | 9,05                              | 2,768               | 0,115            |
|                               | Sin intervención | 97     | 10,30                             | 2,435               |                  |

Fuente: Cuestionario del estudio.

La intervención consistió en un grupo de acciones realizadas entre enero y febrero de 2018. De los 163 médicos de atención primaria incluidos en la primera encuesta, 156 continuaron el estudio (95,70%). Las acciones de intervención se llevaron a cabo en tres cantones de la provincia Napo mediante la realización de un ciclo de cinco conferencias de actualización sobre el parásito y la enfermedad que produce. Además, se distribuyó el manual “Angiostrongiliasis. Biología, clínica, diagnóstico y tratamiento a todos los médicos de forma gratuita, así como, la distribución de una selección de artículos científicos relacionados con el tema.

### 4.3.3. Evaluación del impacto de la intervención educativa

Se aplicó la misma encuesta que permitió el establecimiento de líneas base en relación con el presente estudio.

#### Respuesta sobre aspectos cognoscitivos

Posterior a la intervención, la media de respuestas correctas a las 21 preguntas relacionadas con aspectos cognoscitivos mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,004$ ) al comparar la media de respuestas correctas de los médicos incluidos en ambos grupos (15,89 en el grupo con intervención y 10,28 en el grupo sin intervención) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de la media de respuestas correctas de los médicos después de la intervención educativa según grupo con intervención y sin intervención, República del Ecuador, 2017-2018.

| Tiempo                          | Grupos           | Número | Media de las respuestas correctas | Desviación estándar | <i>P</i> (valor) |
|---------------------------------|------------------|--------|-----------------------------------|---------------------|------------------|
| Después de la fase intervención | Con intervención | 64     | 15,89                             | 3,908               | 0,004            |
|                                 | Sin intervención | 92     | 10,28                             | 3,014               |                  |

Fuente: Cuestionario del estudio.

La media de las respuestas correctas de los médicos pertenecientes al grupo con intervención fue de 9,05, con la aplicación de la encuesta por primera vez. Esta media, experimentó un aumento significativo a 15,89 ( $P = 0,000$ ) después de la intervención educativa, que se evidenció con la aplicación de la misma encuesta por segunda vez (Tabla 5). Sin embargo, en el grupo sin intervención, la media de respuestas correctas de los médicos, en la primera vez de aplicada la encuesta fue de 10,30 y de 10,28 en la segunda vez de aplicada la misma. No se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,924$ ) en la calidad de las respuestas de los médicos al comparar los resultados de las dos encuestas realizadas (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de las medias de las respuestas correctas de los médicos antes y después de la fase de intervención educativa, según grupo con y sin intervención, República del Ecuador, 2017-2018.

| <b>Grupos</b>    | <b>Tiempo</b>              | <b>Número</b> | <b>Media de las respuestas correctas</b> | <b>Desviación estándar</b> | <b>P (valor)</b> |
|------------------|----------------------------|---------------|--|----------------------------|------------------|
| Con intervención | Antes de la intervención   | 66            | 9,05                                     | 2,768                      | 0,000            |
|                  | Después de la intervención | 64            | 15,89                                    | 3,908                      |                  |
| Sin intervención | Antes de la intervención   | 97            | 10,30                                    | 2,435                      | 0,924            |
|                  | Sin intervención           | 92            | 10,28                                    | 3,014                      |                  |

Fuente: Cuestionario del estudio.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la comparación del porcentaje de médicos con respuestas correctas a las preguntas sobre aspectos cognoscitivos del grupo con intervención, según tema, antes y después de la intervención educativa. De manera general, como se esperaba, a partir de la intervención educativa realizada a los médicos del grupo intervención, la proporción de respuestas correctas incrementó en todos los temas evaluados de manera significativa.

Tabla 7. Comparación del porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas antes y después de la fase de intervención educativa, según tema, Napo, República del Ecuador 2017-2018.

| <b>TEMAS</b>  | <b>Porcentaje de médicos encuestados con respuesta correcta (%)</b> |  | <b>P (valor)</b> |
|---------------|---|--|------------------|
|               | <b>Antes de la intervención (n=66)</b>                              | <b>Después de la intervención (n=64)</b> |                  |
| Generalidades | 63,13   | 83,85                                    | 0,00             |
| Ciclo de vida | 34,09   | 77,60                                    | 0,00             |
| Clínica       | 42,80   | 71,09                                    | 0,00             |
| Diagnóstico   | 56,43   | 83,98                                    | 0,00             |
| Tratamiento   | 34,09   | 67,18                                    | 0,00             |
| Prevención    | 26,51   | 58,59                                    | 0,00             |

Fuente: Cuestionario del estudio.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos al comparar el porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas a preguntas que indagaban en aspectos cognoscitivos sobre angiostrongiliasis humana, antes y después de la fase de intervención educativa, según aspectos o tópicos evaluados en cada tema:

#### Generalidades

- ✓ Una alta proporción de encuestados conocen que la angiostrongiliasis es una enfermedad de etiología parasitaria (92,42%, 61/66, antes vs. 98,44%, 63/64, después  $P = 0,500$ ).
- ✓ Después de la intervención, se incrementó en más de la mitad los encuestados que consideraron correctamente que el parásito, con frecuencia, se localiza geográficamente en el sureste asiático (25,76%, 17/66, antes vs. 59,38%, 38/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ Una mayor proporción de médicos consideraron adecuadamente que la vía de transmisión por la que se adquiere la enfermedad es por la ingestión de moluscos y caracoles crudos (71,21%, 47/66, antes vs. 93,75%, 60/64, después  $P = 0,002$ ).

#### Ciclo de vida

- ✓ Con posterioridad a la puesta en marcha de las acciones, se incrementó, el número de encuestados que opinan que los hospederos definitivos habituales son las ratas y otros roedores (33,33%, 22/66, antes vs. 92,19%, 59/64, después  $P = 0,000$ ). mientras que los hospederos intermedios habituales son diferentes tipos de moluscos y caracoles (42,42%, 28/66, antes vs. 89,06%, 57/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ Se incrementó la proporción de encuestados que señalaron adecuadamente, que la localización preferente del parásito en su forma adulta es en pulmones de ratas y otros roedores (18,18%, 12/66, antes vs. 64,06%, 41/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ En casi cinco veces se incrementó de manera significativa, el número de médicos que consideran que *A. cantonensis* en su forma larvaria se localiza preferentemente en el cerebro de humanos. (15,15 %, 10/66, antes vs. 70,31%, 45/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ También fue significativo el incremento en la proporción de médicos que identifican al hombre y otros mamíferos como hospederos accidentales. (57,58%, 38/66, antes vs. 93,75%, 60/64, después  $P = 0,000$ ).

- ✓ Una proporción de encuestados (37,88%, 25/66, antes vs. 56,25%, 36/64, después) que consideró correctamente que L3 es la forma infectante del parásito para el hombre ( $P = 0,117$ ).

#### Clínica

- ✓ Posterior a la intervención, la mayoría de los participantes conocen que las manifestaciones clínicas más características son meningitis encefalitis y lesiones oculares con marcada eosinofilia. (57,58%, 38/66, antes vs. 95,31%, 61/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ El comportamiento fue similar para aquellos que respondieron correctamente que el periodo de incubación de la enfermedad es de 1 a 3 semanas (48,48%, 32/66, antes vs. 62,50%, 40/64, después  $P = 0,096$ ).
- ✓ Una mayor proporción de encuestados consideran que la mayor parte de las infecciones producida por *A. cantonensis* se resuelven espontáneamente, sin tratamiento específico (50,00%, 33/66, antes vs. 81,25%, 52/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ Posterior a la intervención, se incrementó en tres veces, el número de médicos que señalan que la enfermedad usualmente tiene una duración de 2 a 8 semanas (15,15%, 10/66, antes vs. 45,31%, 29/64, después  $P = 0,000$ ).

#### Diagnóstico

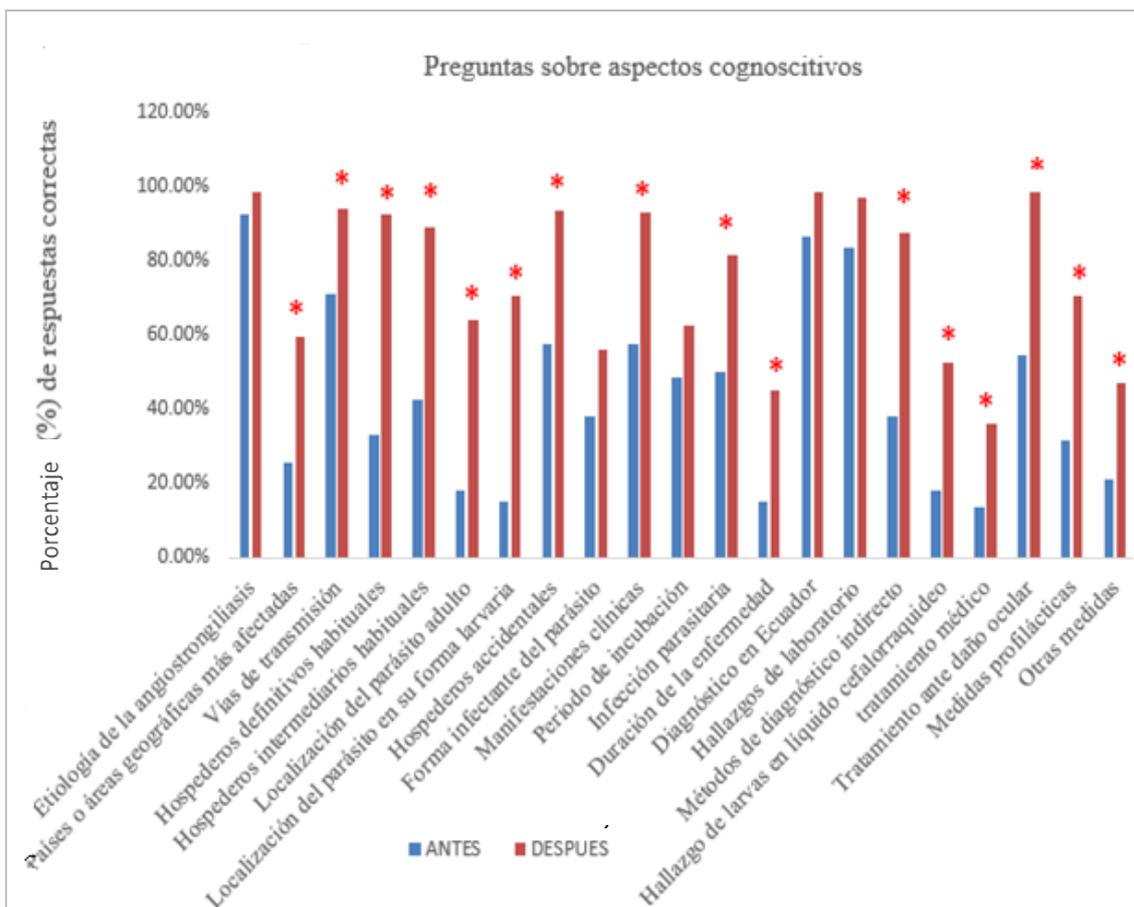
- ✓ Más de 85% de los encuestados, antes y posterior a la intervención, conoce que el diagnóstico de la angiostrongiliasis en Ecuador se basa fundamentalmente en la sintomatología clínica y en los antecedentes epidemiológicos (86,36%, 57/66, antes vs. 98,44%, 63/64, después  $P = 0,070$ ).
- ✓ La mayoría consideran que la eosinofilia de más de 10% en LCR, es el hallazgo de laboratorio más significativo en pacientes con angiostrongiliasis (83,33%, 55/66, antes vs. 96,88 %, 62/64, después  $P = 0,039$ ).
- ✓ Se duplicó la proporción de encuestados que opinan que los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) e inmunotransferencia tienen una sensibilidad media y baja especificidad (37,88%, 25/66, antes vs. 87,50%, 56/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ Se incrementó en casi tres veces la proporción de médicos que respondieron correctamente que solo en 1% de los casos es posible hallar larvas de *A. cantonensis* en LCR (18,18%, 12/66, antes vs 53,13%, 34/64, después  $P = 0,000$ ).

### Tratamiento

- ✓ Un mayor número de encuestados opina que la conducta más efectiva para el tratamiento de la angiostrongiliasis es el uso de corticosteroides como terapia única y/o albendazol o mebendazol. (13,64%, 9/66, antes vs. 35,94%, 23/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ Casi la totalidad de los médicos después de la intervención conocen que la mejor opción de tratamiento en los pacientes que presenten daño ocular es la remoción quirúrgica del parásito intraocular (54,55%, 36/66, antes vs. 98,44 %, 63/64, después  $P = 0,000$ ).

### Prevención

- ✓ Una mayor proporción de médicos consideran que la cocción adecuada de caracoles o moluscos antes de ser ingeridos es el aspecto de prevención que más debe considerarse (31,82%, 21/66, antes vs. 70,31%, 45/64, después  $P = 0,000$ ).
- ✓ Casi la mitad de los encuestados respondieron correctamente que ninguna otra de las medidas profilácticas mencionadas, como uso de vacunas, uso de antihelmínticos, exámenes periódicos de heces y detección de anticuerpos en suero, podían prevenir la infección (21,21%, 14/66, antes vs. 46,88%, 30/64, después  $P = 0,000$ ).



\*Estadísticamente significativo

Figura 9. Comparación del porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas a preguntas que indagaban en aspectos cognoscitivos sobre angiostrongiliasis humana, antes y después de la intervención educativa, según tópicos evaluados en el tema, Napo, República del Ecuador 2017-2018.

En la figura 10 se muestra la comparación del porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas a preguntas que indagaban en aspectos de percepción sobre angiostrongiliasis humana, antes y después de la intervención educativa, según aspectos evaluados en el tema. En cuanto a la percepción que tienen los entrevistados en relación a la infección por *A. cantonensis* como causa poco frecuente de la enfermedad en la República del Ecuador, la misma no se modificó posterior a la intervención educativa (53,03%, 35/66, antes vs. 70,31%, 45/64, después,  $P = 0,870$ ). De igual manera, para el otro aspecto evaluado el comportamiento fue similar, poco más de la mitad de los médicos encuestados continúan pensando, después de la intervención, que los

conocimientos recibidos sobre la enfermedad en las universidades fueron insuficientes (66,67%, 44/66, antes vs. 62,50%, 40/64, después  $P = 0,864$ ) (Figura 10).

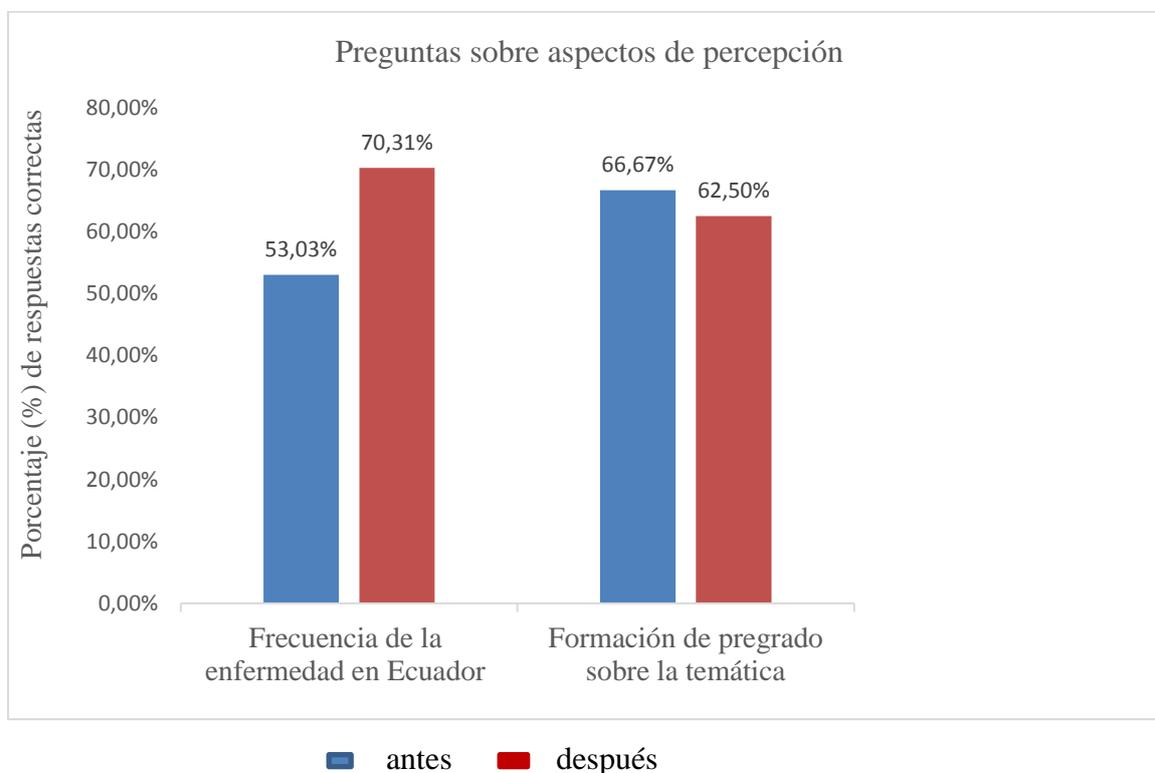
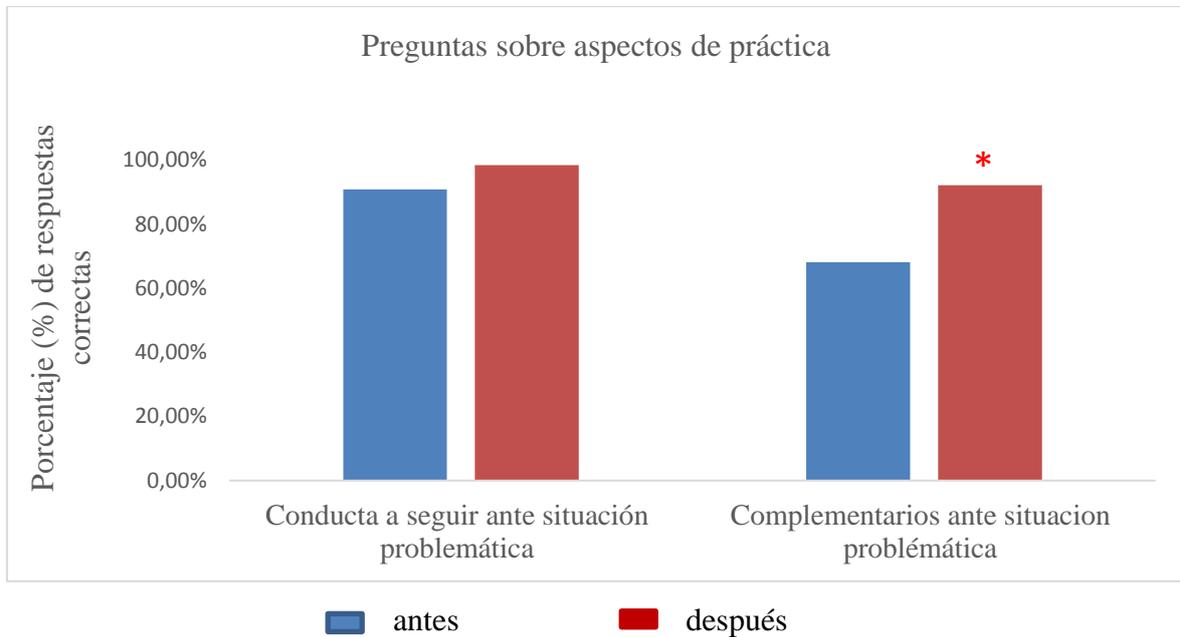


Figura 10. Comparación del porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas a preguntas que indagaban en aspectos de percepción sobre angiostrongiliasis humana, antes y después de la intervención educativa, según tópicos evaluados en el tema, Napo, República del Ecuador 2017-2018.

En la figura 11 se muestra el porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas a preguntas que indagaban en aspectos prácticos sobre angiostrongiliasis humana, antes y después de la intervención educativa, según los tópicos abordados en el tema. En cuanto al aspecto sobre la conducta a seguir ante la presencia de signos y síntomas neurológicos y antecedentes de ingestión de caracoles, una alta proporción de encuestados contestó correctamente, antes y después de la intervención educativa, que se debe buscar atención hospitalaria, lo más pronto posible ante situaciones como esta (90,91%, 60/66, antes y 98,44%, 63/64, después,  $P = 0,250$ ). Sin embargo, en cuanto al otro aspecto, una mayor proporción de médicos respondió correctamente que la búsqueda del parásito y conteo de eosinófilos en el LCR y en sangre son los exámenes

de laboratorio idóneos para confirmar el diagnóstico, posterior a la intervención educativa (68,18%, 45/66, antes vs. 92,19%, 59/64, después  $P = 0,04$ ).



\*Estadísticamente significativo

Figura 11. Comparación del porcentaje de médicos encuestados con respuestas correctas a preguntas que indagaban en aspectos prácticos sobre angiostrongiliasis humana, antes y después de la intervención educativa, según aspectos evaluados en el tema, Napo, República del Ecuador 2017-2018.

## **DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

### **5.1. Prevalencia e intensidad promedio de infección por *Angiostrongylus cantonensis* en *Lissachatina fulica* de localidades de tres cantones de Napo, República del Ecuador**

Los resultados revelan una amplia distribución de *L. fulica* infectado con *A. cantonensis* y de una alta prevalencia e intensidad de infección, lo que tiene implicaciones para la transmisión zoonótica del parásito, ya que la infección humana está directamente relacionada con la ingestión de hospederos intermediarios infectados, como principal vía de transmisión. Esto indica que un número considerable de personas están en riesgo de adquirir la parasitosis, ya sea por las tradiciones culinarias existentes o por la contaminación de alimentos con las larvas infectantes. Las estrategias para minimizar la infección en humanos deben incluir intervenciones educativas dirigidas a la comunidad, control de caracoles para reducir las posibilidades de ingestión, cocción de hospederos intermediarios y educación sobre la preparación de alimentos para prevenir la aparición de casos esporádicos y de brotes de la enfermedad.

En Cuba se informan prevalencias de infección por *A. cantonensis* de hospederos intermediarios de más de 60% (237), en China 13,40 % (238), 22,66% (58) y 10,76 (239), en Tailandia 12,38% (240) y 1,10% (241); en Brasil mayores a 50% en la municipalidad de San Gonzalo (242) y Rio de Janeiro 5,5% (243); en Colombia 89,0% (14) Filipinas 18,27% (244) y de 19,3% y 0,8% en Mallorca e Islas Canarias (España) (85), (16).

Estudios previos realizados en Napo mostraron prevalencias de hospederos intermediarios infectados de 27,16% (26) y 30,34% (datos INSPI no publicados). En trabajos realizados en otras provincias se observaron prevalencias entre 4 y 8% (245) y de 1,5% (62).

Diferentes factores determinan los niveles de prevalencia y de intensidad de la infección del parásito en los hospederos intermediarios. En general, los caracoles de sitios verdes, fríos y lluviosos tienen niveles de infección más altos que los caracoles de sitios secos y cálidos con menos vegetación verde (246).

Napo presenta abundante vegetación tropical, con precipitaciones todo el año, un clima promedio de 22,5°C, y humedad de 90,0 % (247) y con condiciones ideales para un incremento de la prevalencia e intensidad de la infección por *A. cantonensis* en hospederos intermediarios.

Los vectores transmisores de agentes patógenos se propagan por los continentes debido al transporte humano, al cambio de uso de la tierra, mayor conectividad y globalización. La detección temprana y la comprensión profunda de las especies invasoras y las enfermedades infecciosas requieren una red integrada de plataformas de investigación e intercambio de información para identificar los puntos críticos de invasión o aparición de enfermedades. La comprensión de las interacciones entre las especies invasoras, los vectores transmisores de agentes patógenos con otros impulsores del cambio del ecosistema es fundamental para la salud humana y el bienestar económico (248). Estas poblaciones invasoras transforman las comunidades y los ecosistemas (249). El impacto del cambio climático sobre los patógenos es también importante, puede ser directo, al influir en la supervivencia, reproducción y ciclo de vida de los patógenos, o indirecto, al influir en el hábitat, el medio ambiente o los competidores de los patógenos. Como resultado, no solo la cantidad, sino también la distribución geográfica y estacional de los patógenos pueden cambiar (250).

La gran cantidad de ratas y moluscos que pueden ser susceptibles a la infección por *A. cantonensis*, unido a la costumbre de ingerir caracoles y moluscos crudos de gran parte de la población ecuatoriana, hacen que el control de esta enfermedad sea un problema complejo (13).

En estudios previos se plantea que la presencia de *L. fulica* juega un papel importante en la dispersión de *A. cantonensis* y en la infección del hospedero definitivo (119). (69). Es probable que la alta prevalencia de caracoles infectados en Napo se deba a la propagación de *L. fulica*.

A medida que el clima cambia, se espera que *A. cantonensis*, una especie tropical/subtropical, se extienda más hacia lugares que actualmente son demasiado fríos. El aumento de la conciencia sobre este parásito, poco conocido y la enfermedad grave y potencialmente mortal que causa, en la comunidad médica y entre los productores y consumidores de productos agrícolas, garantiza que se minimicen las infecciones futuras (196).

## 5.2. Estudios de filogenia

Considerando, según la literatura consultada, que no existe información sobre la genética de este parásito en la República del Ecuador, el presente trabajo propone establecer las relaciones filogenéticas de especímenes ecuatorianos con aislamientos de otras regiones del mundo. El resultado del análisis filogenético mostró que los aislamientos de origen ecuatoriano a diferencia de los grupos previamente caracterizados (186), (173), (188) se agrupan en un solo clado, lo que representa un hallazgo para los estudios de diversidad genética del parásito en América Latina y el resto del mundo.

La ausencia de diversidad genética entre los aislamientos sugiere que la introducción de *A. cantonensis* en el país ha sido reciente lo que se condice con las primeras comunicaciones sobre la presencia de *L. fulica*, uno de los principales vectores de *A. cantonensis*, que fue introducido con fines comerciales en Ecuador a mediados a mediados de 1990 (61). En otras latitudes, la diseminación del parásito se ha correlacionado con la propagación de *L. fulica* (34). *A. cantonensis* se notificó por primera vez en Nueva Orleans en ratas en 1987, también se realizó la infección experimental en varias especies de caracoles (78). Su diseminación probablemente se produjo a través de ratas infectadas procedentes de barcos que atracaban en Nueva Orleans, a mediados de la década de 1980 (44).

Otro hallazgo consiste en que las secuencias de aislamientos de *A. cantonensis* de la República del Ecuador comparten un ancestro común reciente con los haplotipos ac5 y ac8 de Brasil y con el haplotipo Ac5 de Japón, lo que sugiere la posibilidad de que existe una relación de parentesco entre los aislamientos de estos países. La confirmación de esta hipótesis necesitará de nuevos estudios, que incluyan el análisis de redes de haplotipos (251) y la secuenciación de otras regiones cromosómicas o

mitocondriales del parásitos o genomas completos, con el uso de otras tecnologías como la NGS (151).

En un estudio realizado por Tokiwa y colaboradores en 2012, se obtuvieron las secuencias de *A. cantonensis* procedentes de ubicaciones geográficas de Japón, China continental, Taiwán y Tailandia. El análisis filogenético mostró 7 haplotipos diferentes (ac1 a ac7). Los haplotipos encontrados fueron 5 en Japón (ac1, ac2, ac3, ac5 y ac7), 2 en China continental (ac2 y ac6) y solo se identificó un haplotipo en Taiwán (ac1) (186). De manera similar, solo se identificó un único haplotipo, ac4, de dos parásitos mantenidos en un laboratorio en Tailandia. Los resultados de este estudio también mostraron que el mismo haplotipo se encontró en zonas geográficas distantes. Las especies invasoras frecuentemente experimentan efectos fundadores, de ahí la poca variabilidad genética (186).

En Brasil, análisis filogenéticos realizados con secuencias parciales de *co1* de *A. cantonensis* determinaron la presencia de tres haplotipos diferentes: ac5, ac8 y ac9. Este último está restringido a la zona portuaria y podría haber ingresado al país a través del comercio desde Asia. Asimismo, se considera que los aislados brasileños que corresponden al haplotipo ac5 de Japón, ingresaron por Río de Janeiro o São Paulo también desde el continente asiático. Esta hipótesis también se considera para el haplotipo brasileño más abundante ac8, que muestra la posible propagación desde el área de llegada hacia las regiones sureste, noreste y norte, probablemente a través del caracol gigante africano. La variación genética observada entre los aislados brasileños apoya la hipótesis de que la aparición de *A. cantonensis* en Brasil es resultado de múltiples introducciones de ratas portadoras del parásito y de los caracoles que actúan como hospederos intermediarios. Éstos probablemente fueron transportados en barcos debido al comercio con África y Asia durante el período de la colonización europea y se dispersaron a través del transporte humano, volviéndose endémicos en las zonas portuarias (187).

Los resultados obtenidos en otro estudio para los haplotipos ac8 y ac9 brasileño identificados por el marcador molecular del gen *co1* mostraron diferentes perfiles biológicos, morfológicos y morfométricos, lo que sugiere la posible influencia de la separación geográfica en el desarrollo de las variaciones en los haplotipos (252).

A partir del estudio de secuencias de *A. cantonensis* de Tailandia y Camboya se obtuvieron 13 haplotipos. Dos de estos haplotipos (ac2 y ac5) habían sido notificados previamente en Brasil y Asia. Una muestra del parásito obtenida en Myanmar exhibió el haplotipo ac2. Además, se encontraron cuatro nuevos haplotipos ac10-ac13, que no se habían notificado previamente en Tailandia y Camboya (173).

En Tailandia, los diferentes haplotipos de *A. cantonensis* al parecer están confinados a localidades específicas: el haplotipo ac4 a Bangkok en la parte central del país, ac10 y ac11 a la provincia de Khon Kaen en el noreste, ac13 a la provincia de Surat Thani en el sur, ac14 a la provincia de Kanchanaburi en el oeste, ac15 a la provincia de Trat en el este y ac16 a la provincia de Chanthaburi en el este (180).

Con la utilización de métodos de secuenciación de nueva generación del genoma completo, se ensambló y analizó el ADNmt completo de cuatro aislados de *A. cantonensis* procedentes de cuatro localidades geográficamente dispares fuera del área de distribución endémica del parásito: Sydney (Australia), Hawaii (EUA), Islas Canarias (España) y Fatu Hiva (Polinesia Francesa). La comparación de los genomas mitocondriales de *A. cantonensis* de fuera del Sudeste Asiático mostró una baja diversidad genética (0,02-1,03%) dentro de un único linaje de *A. cantonensis*. Tanto *co* 1 como *co* 2 se consideraron los marcadores de elección para la identificación de haplotipos de *A. cantonensis*. La uniformidad observada en las cepas invasoras implica que sólo ciertos linajes genéticos de *A. cantonensis* tienen la capacidad de convertirse en invasores globales (253).

En otro estudio, se identificaron haplotipos distintos en siete regiones de Tailandia: ac10 en Phitsanulok (región septentrional), ac11 en Nakhon Phanom (región nororiental), ac15 en Trat (región oriental), ac16 en Chantaburi (región oriental), ac4 en Samut Prakan (región central), ac14 en Kanchanaburi (región occidental) y ac13 en Ranong (región meridional). El análisis filogenético reveló que estos haplotipos formaban linajes distintos. Este estudio confirma además la presencia de diversidad de haplotipos *co* 1 en varios aislamientos geográficos de *A. cantonensis* (254).

En Mallorca, en un estudio reciente realizado por Delgado-Serra en 2022, todos los gusanos adultos secuenciados tenían el mismo haplotipo y eran 100% congruentes con los descritos en Australia, Nueva Orleans, Taiwán y Tenerife. El haplotipo único

encontrado en todos los especímenes podría explicarse por la reciente expansión del área de distribución de este parásito y podría ser el resultado de un único evento de colonización. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el origen de la invasión de esta especie de parásito (255).

### **5.3. Conocimientos sobre angiostrongiliasis de médicos de atención primaria de tres cantones de Napo, República del Ecuador, antes y después de una intervención educativa**

La angiostrongiliasis humana es una enfermedad zoonótica y emergente. En función de los resultados obtenidos en la búsqueda extensa realizada en base de datos de artículos científicos relacionados con el tema, podemos considerar que los aspectos sobre los conocimientos de la enfermedad que tienen los médicos de atención primaria en salud a nivel mundial, no han sido evaluados con anterioridad.

La calidad de las respuestas encontradas en los dos grupos de estudio, con y sin intervención, con la aplicación de la encuesta por primera vez fue muy similar, lo que era esperado porque si bien los médicos provenían de diferentes provincias la formación médica que existe en todo el país es similar.

La encuesta aplicada a médicos de atención primaria de ambos grupos de estudio demostró que en relación con la angiostrongiliasis existe un marcado desconocimiento sobre una parte importante de los temas encuestados. En al menos una de las preguntas relacionadas con generalidades, ciclo de vida, manifestaciones clínicas, diagnóstico, tratamiento, prevención y percepción se encontraron deficiencias. Sin embargo, de todos los temas analizados, el relacionado con la práctica médica fue el que mostró los mayores porcentajes de acierto. Esto pudiera estar relacionado con que el tema práctica incluyó aspectos generales del quehacer clínico, donde prima el criterio médico, a diferencia de los otros temas que abordaban preguntas más específicas.

Las insuficiencias en la preparación de los profesionales relacionadas con el adecuado diagnóstico, tratamiento y control de la angiostrongiliasis no es un problema único de la República del Ecuador, y pudiera estar relacionado con una insuficiente preparación profesional sobre las enfermedades parasitarias durante los estudios de pre y posgrado. En trabajos previos se realizan reflexiones muy interesantes sobre la subvaloración que

reciben los programas de estudio de parasitología en las escuelas occidentales de medicina (256), (195).

El desconocimiento sobre aspectos relacionados con parasitismo en otros países, ha sido demostrado en estudios previos acerca de giardiasis (257) y otras parasitosis intestinales (258).

A partir de los brotes epidémicos reportados desde el año 2008 (70), en la República del Ecuador se han generado programas de control y vigilancia epidemiológica frente a la infección (259), sin embargo, se requiere de un conocimiento clínico y epidemiológico adecuado para tener un diagnóstico presuntivo de infección e iniciar una alerta oportuna basada en la vigilancia sindrómica (260).

La comprensión básica de la parasitología es esencial para reducir significativamente los efectos perjudiciales de las enfermedades parasitarias en humanos y animales. La necesidad de mejorar la enseñanza de parasitología en las escuelas de medicina es una realidad cada vez más reconocida incluso en los países desarrollados (261), (262).

Este diseño de estudio valida un cuestionario mediante la aplicación del mismo a médicos que no participan en el estudio, para su posterior puesta en práctica a médicos de atención primaria. El cuestionario permitió conocer sobre los conocimientos, percepciones y prácticas acerca de la infección por *A. cantonensis* del personal de salud y obtener información estadística apropiada que lo convierten en una herramienta útil, que podría ser utilizada para evaluar el impacto de los programas de salud que realizan las autoridades pertinentes, de forma continua, como parte de los programas de vigilancia epidemiológica. Actividades como esta deben extenderse a toda la red nacional de salud, pues sólo el mejoramiento de los programas de aprendizaje en el pregrado y la sostenibilidad de programas de educación continua para el post-grado, permitirá una mejoría continua de los conocimientos, percepciones y prácticas relacionadas con el diagnóstico y el tratamiento de las parasitosis en la Red Nacional de Salud.

Los resultados de la primera aplicación de la encuesta CPP en relación con la angiostrongiliasis a médicos de atención primaria, demostraron insuficiencias cognoscitivas, percepciones inadecuadas y prácticas incorrectas en relación a esta enfermedad. El no encontrar diferencias significativas en las respuestas de los médicos

que laboran en Napo (grupo con intervención) en relación a los médicos que laboran en Guayas (grupo sin intervención), sugiere que el desconocimiento sobre la enfermedad podría estar presente en todo el país.

Para contribuir a la atenuación de las deficiencias encontradas se ejecutó, solo en las Unidades de Salud de los tres cantones de la provincia Napo: Tena, Archidona y Arosemena Tola (grupo con intervención), un grupo de acciones, a modo de intervención educativa, que podría incidir sobre las deficiencias encontradas en relación con la angiostrongiliasis humana.

Una vez realizada la intervención y seis meses más tarde de aplicada la encuesta por primera vez, se aplicó nuevamente la misma a los dos grupos de estudio (con y sin intervención). Esto permitió constatar, un incremento en el nivel de conocimiento de los médicos en la mayoría de los temas evaluados, lo que se evidenció por el mayor número de médicos que respondían correctamente a las preguntas. Sin embargo, como era de esperar, esas diferencias no fueron encontradas en las respuestas de los médicos del grupo sin intervención, los cuales no recibieron la capacitación que les hubiera permitido incrementar sus conocimientos sobre la angiostrongiliasis.

De manera general, resultados similares se han obtenido en estudios que indagan en la preparación de los médicos para un adecuado, diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades parasitarias. En un estudio efectuado con médicos de familia que prestan servicios en los municipios Playa y San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba, se demostró que en relación con el diagnóstico, tratamiento y control de las geohelmintosis existían insuficiencias cognoscitivas, percepciones inadecuadas y prácticas incorrectas por parte de los médicos encuestados, lo que puso de manifiesto la necesidad de intervenciones educativas para el control de las parasitosis (256).

En un estudio realizado en la provincia de Guantánamo, Cuba, por Blanco y colaboradores sobre aspectos esenciales del diagnóstico, tratamiento y prevención de la helmintiasis por *Inermicapsifer madagascariensis*, se observó una mejoría en el conocimiento de los temas analizados, luego de una intervención educativa (263).

En otros estudios similares las estrategias que incluyeron un grupo de acciones, a modo de intervención, ante insuficiencias cognoscitivas, percepciones inadecuadas y prácticas incorrectas, permitieron atenuar estas deficiencias (264) (265).

Los resultados de este tipo de intervención han mostrado ser satisfactorios en otros estudios como el realizado en el Municipio Guanabacoa provincia La Habana, lo que permitió perfeccionar el trabajo de los profesionales de salud y produjo una mejoría estadísticamente significativa de las evaluaciones en temas relacionados con parasitismo intestinal. Ello evidencia la eficacia y necesidad de programas educativos basados en conferencias, cursos, distribución de material científico actualizado, publicación de algún libro sobre el tema, entre otros (194).

En este mismo orden de idea, en un estudio realizado en Angola y publicado en el año 2016 por Pembele y colaboradores, se demostraron insuficiencias teóricas y prácticas en el diagnóstico microscópico de la malaria por parte del personal técnico que realiza esta actividad en Luanda. Los resultados de la realización de una intervención educativa fueron efectivos pues permitieron mejorar significativamente los conocimientos teóricos y habilidades prácticas relacionados con el diagnóstico de la enfermedad, en el grupo de intervención en comparación con el grupo control (266).

Mena, Tudela y colaboradores, evaluaron la efectividad de una intervención educativa realizada en el programa de segundo año del Grado en Enfermería de la Universidad Jaime I (España) sobre los conocimientos, habilidades y actitudes del estudiantado hacia la práctica basada en la evidencia. Los resultados muestran que esta intervención educativa puede mejorar en general la competencia práctica, principalmente en los temas de conocimientos y actitudes. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el tema habilidades (267).

Son varios los estudios en los que se logra una mejoría significativa en las evaluaciones realizadas, lo que demuestra la eficacia de la intervención. De ahí la necesidad de monitorear y actualizar con regularidad los programas de formación de médicos y especialistas en los aspectos relacionados con el diagnóstico, tratamiento y control de las enfermedades parasitarias (264), enfatizando la necesidad de programas educativos basados en conferencias, cursos, distribución de material científico actualizado, publicación de algún libro sobre el tema. Sin embargo, se considera que estas acciones deben tener sostenibilidad y sistematicidad para alcanzar una mejoría continua de los CPP relacionadas con el diagnóstico y el tratamiento de las parasitosis (257).

Resulta importante mencionar que estas falencias en la enseñanza de la parasitología se observan en todas las latitudes (268). Existe una necesidad creciente en los países occidentales de fortalecer la enseñanza de esta rama de la Microbiología y de formar parasitólogos que puedan enfrentar los desafíos de la aparición de las que alguna vez fueron consideradas enfermedades de la pobreza (262).

Tanto la comunidad médica como el público en general deben ser más conscientes de los problemas que trae consigo la angiostrongiliasis, una enfermedad no muy común pero potencialmente mortal. Una mayor comprensión sobre la enfermedad entre la comunidad médica reducirá la probabilidad de que los enfermos sean diagnosticados erróneamente en las clínicas de atención primaria y en las salas de urgencias o esperen semanas o meses antes de recibir un diagnóstico preciso. Además un diagnóstico y tratamiento oportuno producirán resultados clínicos más favorables (269)

Los resultados encontrados en este estudio constituyen una alerta a las autoridades de salud de Napo. Se sugiere la necesidad de preparar programas de educación médica continua relacionados con esta parasitosis para el personal de salud en funciones. Esto sería con la finalidad de que estén mejor capacitados en el abordaje integral de la enfermedad incluyendo el diagnóstico diferencial con otras entidades infectocontagiosas. De esta forma, se podrá efectuar una constante retroalimentación que trascienda de forma positiva en la formación de futuras generaciones de profesionales y técnicos de la salud.

### **Consideraciones generales**

Los resultados de este trabajo revelan una amplia distribución de *L. fulica* infectado con *A. cantonensis*, en tres cantones de la provincia Napo, lo que indica que un número considerable de personas pudieran estar en riesgo de contraer la enfermedad. En este sentido, las estrategias para reducir la infección humana deben estar orientadas a la realización de intervenciones educativas dirigidas a la comunidad, al control de hospederos intermediarios y a la educación sobre la preparación de alimentos. que incluye la cocción adecuada de caracoles.

La existencia de hospederos intermediarios y definitivos de *A. cantonensis* en casi todo el país ha contribuido al carácter endémico de su distribución haciendo del control de esta enfermedad un problema complejo (13). Los principales hospederos intermediarios

(*L. fulica*) y definitivos (*R. rattus* y *R. norvegicus*) no son especies nativas de Ecuador y han sido considerados entre las 100 especies invasoras más importantes del mundo (68). La adición de nuevas especies invasoras a un ecosistema puede traer consigo la colonización del entorno, formar nuevas poblaciones y causar impactos en la biodiversidad, la salud y la economía. Los vectores de enfermedades y patógenos se propagan por los continentes debido al transporte humano, al cambio de uso de la tierra y al cambio climático. Muchas especies presentes en el ecosistema pueden influir en el bienestar humano de forma positiva o negativa, y constituye una preocupación de que la introducción de nuevas especies pueda resultar en nuevas interacciones bióticas y modificar las existentes en los ecosistemas actuales (248).

El resultado del análisis filogenético de once secuencias nucleótidas obtenidas de once provincias de la República del Ecuador, ubicadas en diferentes regiones geográficas y climáticas, mostró que los aislamientos de origen ecuatoriano se agrupan en un solo clado diferente a otros previamente caracterizados en otras partes del mundo. Esta poca diversidad genética, al estudiar una región del gen que codifica la *citocromo oxidasa 1*, pudiera estar dado por la posible introducción reciente del parásito en Ecuador. Además, también se obtuvo que el grupo de secuencias de Ecuador comparte un ancestro común reciente con los haplotipos ac5 y ac8 de Brasil y ac5 de Japón.

Por otra parte, las estrategias que incluyeron un grupo de acciones, a modo de intervención, ante insuficiencias cognoscitivas, percepciones inadecuadas y prácticas incorrectas han mostrado también ser satisfactorias (264), (265), (194). Todo esto evidencia la necesidad de fortalecer los programas educativos que contribuyan al control de las parasitosis.

Con la aplicación de una encuesta sobre CPP a médicos vinculados con el diagnóstico, tratamiento y control de la angiostrongiliasis, se demostró que existen insuficiencias en los temas mencionados. Las estrategias que incluyeron realizar un grupo de acciones, a modo de intervención educativa, evaluadas a través de los CPP de médicos de atención primaria, permitieron atenuar estas deficiencias. Estudios como este constituyen un llamado de atención a los responsables de la educación médica del país, con la finalidad de tomar medidas que contribuyan a una mejor preparación del personal de salud y por otra parte, permiten la evaluación del impacto de programas educativos con el propósito de fortalecer la vigilancia epidemiológica de las parasitosis.

Con este trabajo, se corroboró la alta prevalencia de hospederos intermediarios infectados con *A. cantonensis* en Napo. Asimismo, se constató falta de conocimientos de los médicos de atención primaria sobre la angiostrongiliasis y se comprobó el efecto positivo de una intervención educativa. Finalmente, los estudios de filogenia determinaron la existencia de un nuevo haplotipo, así como la ausencia de diversidad genética del parásito en las 11 provincias estudiadas de la República del Ecuador.

## **CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

- La elevada prevalencia e intensidad promedio de infección de *A. cantonensis* en *L. fulica* de tres cantones de la provincia Napo, constituye una alerta para las autoridades sanitarias, teniendo en cuenta que la población manipula y consume caracoles crudos.
- Los aislamientos de *A. cantonensis* de origen ecuatoriano se agrupan en un clado diferente a los aislados de otras regiones del mundo y las secuencias de nucleótidos de estos aislamientos, comparten un ancestro común con haplotipos de Brasil y Japón, lo que representa un hallazgo novedoso para los estudios de diversidad genética del parásito.
- Luego de las deficiencias encontradas, después de la aplicación de la encuesta por primera vez, en los médicos de atención primaria sobre la angiostrongiliasis, la intervención educativa realizada contribuyó a la mejora del conocimiento de esta parasitosis, lo que podría contribuir a su mejor manejo y control.

## **RECOMENDACIONES**

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Comunicar a las autoridades de salud de la provincia los resultados del presente estudio y propiciar campañas de divulgación para evitar el consumo de caracoles crudos.
- Realizar la búsqueda de *A. cantonensis* en hospederos definitivos de los tres cantones estudiados.
- Ampliar el estudio filogenético de *A. cantonensis* con un mayor número de muestras y otros blancos genéticos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen TH. Un nouveau nematode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis*, n. g., n. sp. des rats de Canton. Ann Parasitol Hum Comp. 1 de julio de 1935;8(4):312-7.
2. Martins YC, Tanowitz HB, Kazacos KR. Central nervous system manifestations of *Angiostrongylus cantonensis* infection. Acta Trop. enero de 2015;141(Pt A):46-53.
3. Botero D, Restrepo, Marcos. Parasitosis humana. 6ta ed. Medellin, Colombia: CIB; 2019. 679–723. p.
4. Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongyliasis. Lancet Infect Dis. 2008;8(10):621-30.
5. Wang QP, Wu ZD, Wei J, Owen RL, Lun ZR. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. abril de 2012;31(4):389-95.
6. Murphy GS, Johnson S. Clinical Aspects of Eosinophilic Meningitis and Meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm. Hawaii J Med Public Health. junio de 2013;72(6 Suppl 2):35-40.
7. Cowie RH. Biology, Systematics, Life Cycle, and Distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the Cause of Rat Lungworm Disease. Hawaii J Med Public Health. junio de 2013;72(6 Suppl 2):6-9.
8. Prociv P, Carlisle MS. The spread of *Angiostrongylus cantonensis* in Australia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2001;32 Suppl 2:126-8.
9. Rael RC, Peterson AC, Ghersi-Chavez B, Riegel C, Lesen AE, Blum MJ. Rat Lungworm Infection in Rodents across Post-Katrina New Orleans, Louisiana, USA. Emerg Infect Dis. [citado 14 de diciembre de 2022]; Disponible en: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/12/18-0056\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/12/18-0056_article)
10. Yousif F, Ibrahim A. The first record of *Angiostrongylus cantonensis* from Egypt. Z Parasitenkd. 3 de julio de 1978;56(1):73-80.
11. Archer CE, Appleton CC, Mukaratirwa S, Hope KJ. The rat lung-worm *Angiostrongylus cantonensis*: a first report in South Africa. SAMJ: S. Afr. Med. J. marzo de 2011;101(3):174-5.
12. Caldeira RL, Mendonça CL, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. noviembre de 2007;102(7):887-9.
13. Solorzano LF, Martini Robles L, Hernandez H, Sarracent J, Muzzio J, Rojas L. *Angiostrongylus cantonensis*: un parásito emergente en Ecuador. Rev Cubana Med Trop. 2014;66(1).

14. Giraldo A, Garzón C, Castillo A, Córdoba-Rojas DF, Giraldo A, Garzón C, et al. Confirmation of the presence of *Angiostrongylus cantonensis* in lung tissue of the African giant snail (*Lissachatina fulica*) in Colombia. *Infectio*. junio de 2019;23(2):129-32.
15. Paredes-Esquivel C, Sola J, Delgado-Serra S, Riera MP, Negre N, Miranda MÁ, et al. *Angiostrongylus cantonensis* in North African hedgehogs as vertebrate hosts, Mallorca, Spain, October 2018. *Eurosurveillance*. 15 de agosto de 2019;24(33):1900489.
16. Martín-Carrillo N, Feliu C, Abreu-Acosta N, Izquierdo-Rodríguez E, Dorta-Guerra R, Miquel J, et al. A Peculiar Distribution of the Emerging Nematode *Angiostrongylus cantonensis* in the Canary Islands (Spain): Recent Introduction or Isolation Effect? *Animals*. mayo de 2021;11(5):1267.
17. Galán-Puchades MT, Gómez-Samblás M, Osuna A, Sáez-Durán S, Bueno-Marí R, Fuentes MV. Autochthonous *Angiostrongylus cantonensis* Lungworms in Urban Rats, Valencia, Spain, 2021. *Emerg Infect Dis*. diciembre de 2022;28(12):2564-7.
18. Aguiar PH, Morera P, Pascual J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. *Am J Trop Med Hyg*. septiembre de 1981;30(5):963-5.
19. Valente R, Robles M del R, Navone GT, Diaz JI. *Angiostrongylus* spp. in the Americas: geographical and chronological distribution of definitive hosts versus disease reports. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. marzo de 2018;113(3):143-52.
20. Flerlage T, Qvarnstrom Y, Noh J, Devincenzo JP, Madni A, Bagga B, et al. *Angiostrongylus cantonensis* Eosinophilic Meningitis in an Infant, Tennessee, USA. *Emerging Infect Dis*. 2017;23(10):1756-8.
21. Defo AL, Lachaume N, Cuadro-Alvarez E, Maniassom C, Martin E, Njuieyon F, et al. *Angiostrongylus cantonensis* Infection of Central Nervous System, Guiana Shield. *Emerg Infect Dis*. junio de 2018;24(6):1153-5.
22. Caldeira RL, Mendonça CL, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. noviembre de 2007;102(7):887-9.
23. Graeff-Teixeira C, Morassutti AL, Jones MK. Diagnosing and Understanding Angiostrongyliasis, A Zoonotic Cause of Meningitis. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 21 de marzo de 2018 [citado 23 de diciembre de 2022];9(3):393-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00018>
24. Mboowa G, Sserwadda I, Amujal M, Namatovu N. Human Genomic Loci Important in Common Infectious Diseases: Role of High-Throughput Sequencing and Genome-Wide Association Studies. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 20 de marzo de 2018;2018:1875217.

25. Guerrero M, Vargas FM, Rosero AR, Nuques M de L, Bolaños ES, Briones MT, et al. Meningitis eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis*. Reporte de caso de autopsia. *Medicina*. 30 de septiembre de 2008;13(4):312-8.
26. Solórzano L, Sánchez-Amador F, Valverde T. *Angiostrongylus (Parastrongylus) cantonensis* en huéspedes intermediarios y definitivos en Ecuador, 2014-2017. *Biomedica*. 15 de junio de 2019;39(2):370-84.
27. Spratt DM. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. agosto de 2015;4(2):178-89.
28. Rojas A, Maldonado-Junior A, Mora J, Morassutti A, Rodriguez R, Solano-Barquero A, et al. Abdominal angiostrongyliasis in the Americas: fifty years since the discovery of a new metastrongylid species, *Angiostrongylus costaricensis*. *Parasit Vectors*. 22 de julio de 2021;14(1):374.
29. Cowie - 2011 - Biology taxonomy, identification, and life cycle .pdf [Internet]. [citado 14 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.hawaii.edu/cowielab/1%20Cowie%20Angio%20Workshop.pdf>
30. Dougherty EC. The genus *Aelurostrongylus* Cameron, 1927 (Nematoda: Metastrongylidae), and its relatives; with descriptions of *Parafilaroides*, gen. nov., and *Angiostrongylus gubernaculatus*, sp. nov. *Proc Helminthol Soc Wash*. enero de 1946;13:16-26.
31. Ubelaker JE. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. *J Parasitol*. abril de 1986;72(2):237-44.
32. Duffy MS, Miller CL, Kinsella JM, de Lahunta A. *Parastrongylus cantonensis* in a nonhuman primate, Florida. *Emerging Infect Dis*. diciembre de 2004;10(12):2207-10.
33. Foronda P, López-González M, Miquel J, Torres J, Segovia M, Abreu-Acosta N, et al. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). *Acta Trop*. mayo de 2010;114(2):123-7.
34. Barratt J, Chan D, Sandaradura I, Malik R, Spielman D, Lee R, et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology*. 2016;143(9):1087-118.
35. Chao D, Lin CC, Chen YA. Studies on growth and distribution of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Ampullarium canaliculatus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. junio de 1987;18(2):248-52.
36. Panackel C, Vishad, Cherian G, Vijayakumar K, Sharma R. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24:220-1.
37. Turck HC, Fox MT, Cowie RH. Paratenic hosts of *Angiostrongylus cantonensis* and their relation to human neuroangiostrongyliasis globally. *One Health*. 1 de diciembre de 2022;15:100426.

38. Feng Y, Zeng X, Li WH, Wang WC, Chen W, Ou-Yang L si, et al. The pathogenesis of optic neuritis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in BALB/c mice. *Parasit Vectors*. 22 de julio de 2014;7:339.
39. Sen P, Date A, Jain E, Mohan A. *Angiostrongylus*-a technique for removing a rare parasite from the cornea of a child. *J AAPOS*. abril de 2019;23(2):119-20.
40. Stockdale Walden HD, Slapcinsky JD, Roff S, Mendieta Calle J, Diaz Goodwin Z, Stern J, et al. Geographic distribution of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rats (*Rattus rattus*) and terrestrial snails in Florida, USA. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0177910.
41. Sohal RJ, Gilotra TS, Lui F. *Angiostrongylus Cantonensis*. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 14 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556067/>
42. Lv S, Zhang Y, Chen SR, Wang LB, Fang W, Chen F, et al. Human Angiostrongyliasis Outbreak in Dali, China. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 22 de septiembre de 2009;3(9):e520.
43. Al Hammoud R, Nayes SL, Murphy JR, Heresi GP, Butler IJ, Pérez N. *Angiostrongylus cantonensis* Meningitis and Myelitis, Texas, USA. *Emerg Infect Dis*. junio de 2017;23(6):1037-8.
44. Kim DY, Stewart TB, Bauer RW, Mitchell M. *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* now endemic in Louisiana wildlife. *J Parasitol*. octubre de 2002;88(5):1024-6.
45. Johnston DI, Dixon MC, Elm JL, Calimlim PS, Sciulli RH, Park SY. Review of Cases of Angiostrongyliasis in Hawaii, 2007–2017. *Am J Trop Med Hyg*. septiembre de 2019;101(3):608-16.
46. Morgan ER, Modry D, Paredes-Esquivel C, Foronda P, Traversa D. Angiostrongylosis in Animals and Humans in Europe. *Pathogens*. octubre de 2021;10(10):1236.
47. Thiengo SC, Faraco FA, Salgado NC, Cowie RH, Fernandez MA. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. *Biol Invasions* [Internet]. 8 de agosto de 2007 [citado 22 de septiembre de 2022];9(6):693-702. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10530-006-9069-6>
48. Gutiérrez Gregoric D, Beltramino A, Vogler R, Rumi A. Expansión del rango de distribución de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Gastropoda) en la Argentina y su concordancia con modelos predictivos. *Amici Molluscarum*. 1 de octubre de 2013;21:17-21.
49. Shan, Lv S, Zhou XN, Andrews JR. Eosinophilic Meningitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *ACS Chem Neurosci*. 20 de 2017;8(9):1815-6.

50. Eamsobhana P. Angiostrongyliasis in Thailand: Epidemiology and Laboratory Investigations [Internet]. 2013 [citado 13 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689488/>
51. Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS, et al. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. *N Engl J Med*. 28 de febrero de 2002;346(9):668-75.
52. Tsai HC, Lee SSJ, Huang CK, Yen CM, Chen ER, Liu YC. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*. agosto de 2004;71(2):222-6.
53. Kim JR, Hayes KA, Yeung NW, Cowie RH. Diverse gastropod hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm, globally and with a focus on the Hawaiian Islands. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e94969.
54. Tesana S, Srisawangwong T, Sithithaworn P, Laha T. *Angiostrongylus cantonensis*: experimental study on the susceptibility of apple snails, *Pomacea canaliculata* compared to *Pila polita*. *Exp Parasitol*. abril de 2008;118(4):531-5.
55. Song L, Wang X, Yang Z, Lv Z, Wu Z. *Angiostrongylus cantonensis* in the vector snails *Pomacea canaliculata* and *Achatina fulica* in China: a meta-analysis. *Parasitol Res*. 1 de marzo de 2016;115(3):913-23.
56. Chen CX, He HF, Yin Z, Zhou JH, Li SQ, Li FH, et al. [Investigation on snails *Achatina fulica* and *Pomacea canaliculata* infected with *Angiostrongylus cantonensis* in Panyu region of Guangzhou City]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*. junio de 2012;24(3):336-8.
57. Deng Z hui, Zhang Q ming, Lin R xing, Huang S yu, Zhang Y, Lv S, et al. [Survey on the focus of *Angiostrongylus cantonensis* in Guangdong Province]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. febrero de 2010;28(1):12-6.
58. Hu X, Du J, Tong C, Wang S, Liu J, Li Y, et al. Epidemic status of *Angiostrongylus cantonensis* in Hainan island, China. *Asian Pac J Trop Med*. abril de 2011;4(4):275-7.
59. González Aguilera JC, Arias Ortiz A, González Aguilera JC, Arias Ortiz A. El caracol gigante africano (*Achatina fulica*) y sus efectos en la salud humana. *Multimed*. agosto de 2019;23(4):840-53.
60. Correoso MC, Rodríguez GMC, Burgos JA, Robles LM. *Pomacea canaliculata*, Plaga del arroz en Ecuador. Editorial de las Fuerzas Armadas; 2015.
61. Borrero FJ, Breure ASH, Correoso M, Avila VM. INTO THE ANDES: THREE NEW INTRODUCTIONS OF *LISSACHATINA FULICA* (GASTROPODA, ACHATINIDAE) AND ITS POTENTIAL DISTRIBUTION IN SOUTH AMERICA. *Tenacle*. 2009;(17):3.

62. Martini L, Gomez E, Muzzio J, Solorzano L. Descripción del primer foco de transmisión natural de *Angiostrongylus cantonensis* en Ecuador. En: *Angiostrongylus cantonensis* Emergencia en América. 2016. p. 209-20.
63. Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, et al. Invasive Snails and an Emerging Infectious Disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Negl Trop Dis*. 10 de febrero de 2009;3(2):e368.
64. Monteiro MD, de Carvalho Neto EG, Dos Santos IP, Biernat MS, Machado RM, Hauser VB, et al. Eosinophilic meningitis outbreak related to religious practice. *Parasitol Int*. octubre de 2020;78:102158.
65. Thiengo SC, de Oliveira Simões R, Fernandez MA, Júnior AM. *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. *Hawaii J Med Public Health*. junio de 2013;72(6 Suppl 2):18-22.
66. *Rattus norvegicus* - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citado 6 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/rattus-norvegicus>
67. Tirira S. D. Listado bibliográfico sobre los mamíferos del Ecuador. Quito, Ecuador: EcoCiencia : SimBioE; 2000. 340 p. (Boletines bibliográficos sobre la biodiversidad del Ecuador).
68. Simberloff D, Rejmanek M, editores. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A Selection From The Global Invasive Species Database. En: *Encyclopedia of Biological Invasions* [Internet]. University of California Press; 2019 [citado 29 de enero de 2021]. p. 715-6. Disponible en: <https://california.degruyter.com/view/book/9780520948433/10.1525/9780520948433-159.xml>
69. Kliks MM, Palumbo NE. 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*. enero de 1992;34(2):199-212.
70. Pincay T, García L, Narváez E, Decker O, Martini L, Moreira J. Angiostrongiliasis por *Parastrostrongylus* (*Angiostrongylus*) *cantonensis* en Ecuador. Primer informe en Sudamérica. *Trop Med Int Health*. 2009;14(2):S37.
71. Andersen E, Gubler DJ, Sorensen K, Beddard J, Ash LR. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg*. marzo de 1986;35(2):319-22.
72. Breuil J, Coulanges P. [*Angiostrongylus cantonensis* in Madagascar]. *Arch Inst Pasteur Madagascar*. 1982;50(1):35-8.
73. Udonsi JK. Helminth parasites of wild populations of the black rat, *Rattus rattus* (L.), from urban, rural residential and other ecological areas of Nigeria. *Acta Parasitol. Pol*. 1989;34(2):107-16.

74. Other Tissue Nematodes - ClinicalKey [Internet]. [citado 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323529501003230>
75. Cowie RH. Pathways for Transmission of Angiostrongyliasis and the Risk of Disease Associated with Them. *Hawaii J Med Public Health*. junio de 2013;72(6 Suppl 2):70-4.
76. Martinez J, Gonzalez M. Meningoencefalitis eosinofílica en Villa Clara (Cuba). Estudio de 17 pacientes : *Neurología.com. Rev Neurol*. 2000;31(5):417-21.
77. Sabina Molina D, Espinosa Brito A, Nieto Cabrera R, Chávez Troya O, Romero Cabrera ÁJ, Díaz Torralbas A. Brote epidémico de meningoencefalitis eosinofílica en una comunidad rural. *Rev Cubana Med Trop*. abril de 2009;61(1):0-0.
78. Campbell BG, Little MD. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in new orleans. *Am J Trop Med Hyg*. mayo de 1988;38(3):568-73.
79. Hochberg NS, Blackburn BG, Park SY, Sejvar JJ, Effler PV, Herwaldt BL. Eosinophilic meningitis attributable to *Angiostrongylus cantonensis* infection in Hawaii: clinical characteristics and potential exposures. *Am J Trop Med Hyg*. octubre de 2011;85(4):685-90.
80. Duffy MS, Miller CL, Kinsella JM, de Lahunta A. *Parastrongylus cantonensis* in a Nonhuman Primate, Florida. *Emerg Infect Dis*. diciembre de 2004;10(12):2207-10.
81. Vargas M, Gomez Perez JD, Malek EA. First record of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in the Dominican Republic. *Trop Med Parasitol*. diciembre de 1992;43(4):253-5.
82. Lindo JF, Waugh C, Hall J, Cunningham-Myrie C, Ashley D, Eberhard ML, et al. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerging Infect Dis*. marzo de 2002;8(3):324-6.
83. Raccurt CP, Blaise J, Durette-Desset MC. [Presence of *Angiostrongylus cantonensis* in Haiti]. *Trop Med Int Health*. mayo de 2003;8(5):423-6.
84. Moreira VLC, Giese EG, Melo FTV, Simões 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*. 1 de enero de 2013;125(1):90-7.
85. Ramos-de-Souza J, Thiengo SC, Fernandez MA, Gomes SR, Antônio JC, Clímaco M de C, et al. First records of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in Northeastern Brazil, including new global records of natural intermediate hosts. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60:e51.

86. Martin-Alonso A, Abreu-Yanes E, Feliu C, Mas-Coma S, Bargues MD, Valladares B, et al. Intermediate hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in Tenerife, Spain. PLoS ONE. 2015;10(3):e0120686.
87. Teem JL, Qvarnstrom Y, Bishop HS, da Silva AJ, Carter J, White-McLean J, et al. The occurrence of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, in nonindigenous snails in the Gulf of Mexico region of the United States. Hawaii J Med Public Health. junio de 2013;72(6 Suppl 2):11-4.
88. York EM, Creecy JP, Lord WD, Caire W. Geographic Range Expansion for Rat Lungworm in North America. Emerg Infect Dis. julio de 2015;21(7):1234-6.
89. Dard C, Piloquet JE, Qvarnstrom Y, Fox LM, M'kada H, Hebert JC, et al. First Evidence of Angiostrongyliasis Caused by *Angiostrongylus cantonensis* in Guadeloupe, Lesser Antilles. Am J Trop Med Hyg. 2017;96(3):692-7.
90. Chikweto A, Bhaiyat MI, Macpherson CNL, Deallie C, Pinckney RD, Richards C, et al. Existence of *Angiostrongylus cantonensis* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. Vet Parasitol. 26 de mayo de 2009;162(1-2):160-2.
91. Coomansingh-Springer C, Vishakha V, Acuna AM, Armstrong E, Sharma RN. Internal parasitic burdens in brown rats (*Rattus norvegicus*) from Grenada, West Indies. Heliyon. agosto de 2019;29(5):e02382.
92. Solorzano Luis. Situación actual del diagnóstico serológico en Ecuador. En: *Angiostrongylus cantonensis* Emergencia en América. Editorial Academia; 2016. p. 250-6.
93. Murphy GS, Johnson S. Clinical Aspects of Eosinophilic Meningitis and Meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm. Hawaii J Med Public Health. junio de 2013;72(6 Suppl 2):35-40.
94. Mathison BA, Pritt BS. A Systematic Overview of Zoonotic Helminth Infections in North America. Lab Med [Internet]. 11 de octubre de 2018 [citado 30 de agosto de 2022];49(4):e61-93. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/labmed/lmy029>
95. Kuberski T. Eosinophils in cerebrospinal fluid: criteria for eosinophilic meningitis. Hawaii Med J. abril de 1981;40(4):97-8.
96. Lo Re V, Gluckman SJ. Eosinophilic meningitis. Am J Med. 15 de febrero de 2003;114(3):217-23.
97. Shah I, Barot S, Madvariya M. Eosinophilic meningitis: a case series and review of literature of *Angiostrongylus cantonensis* and *Gnathostoma spinigerum*. Indian J Med Microbiol. marzo de 2015;33(1):154-8.
98. Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lee SS, Chen YS, Lin HH, et al. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. Am J Med. agosto de 2001;111(2):109-14.

99. Punyagupta S, Juttijudata P, Bunnag T. Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. Am J Trop Med Hyg. noviembre de 1975;24(6 Pt 1):921-31.
100. Chau TTH, Thwaites GE, Chuong LV, Sinh DX, Farrar JJ. Headache and confusion: the dangers of a raw snail supper. Lancet. 31 de mayo de 2003;361(9372):1866.
101. Yii CY. Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan. Am J Trop Med Hyg. marzo de 1976;25(2):233-49.
102. Epelboin L, Blondé R, Chamouine A, Chrisment A, Diancourt L, Villemant N, et al. *Angiostrongylus cantonensis* Infection on Mayotte Island, Indian Ocean, 2007-2012. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 4 de mayo de 2016 [citado 20 de noviembre de 2019];10(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856411/>
103. Sinawat S, Trisakul T, Choi S, Morley M, Sinawat S, Yospaiboon Y. Ocular angiostrongyliasis in Thailand: a retrospective analysis over two decades. Clin Ophthalmol. 2019;13:1027-31.
104. Sawanyawisuth K, Kitthaweesin K, Limpawattana P, Intapan PM, Tiamkao S, Jitpimolmard S, et al. Intraocular angiostrongyliasis: clinical findings, treatments and outcomes. Trans R Soc Trop Med Hyg. mayo de 2007;101(5):497-501.
105. Sinawat S, Yospaiboon Y, Sinawat S. Subretinal angiostrongyliasis-induced optic neuritis. Clin Ophthalmol. 2013;7:977-9.
106. Butterworth AE. Cell-mediated damage to helminths. Adv Parasitol. 1984;23:143-235.
107. Sugaya H, Aoki M, Yoshida T, Takatsu K, Yoshimura K. Eosinophilia and intracranial worm recovery in interleukin-5 transgenic and interleukin-5 receptor alpha chain-knockout mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Res. 1997;83(6):583-90.
108. Henry EK, Inclan-Rico JM, Siracusa MC. Type 2 cytokine responses: regulating immunity to helminth parasites and allergic inflammation. Curr Pharmacol Rep. diciembre de 2017;3(6):346-59.
109. Behm CA, Ovington KS. The Role of Eosinophils in Parasitic Helminth Infections: Insights from Genetically Modified Mice. Parasitol Today. mayo de 2000;16(5):202-9.
110. Sugaya H, Yoshimura K. T-cell-dependent eosinophilia in the cerebrospinal fluid of the mouse infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Parasite Immunol. marzo de 1988;10(2):127-38.
111. Sasaki O, Sugaya H, Ishida K, Yoshimura K. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. Parasite Immunol. junio de 1993;15(6):349-54.

112. Morassutti AL, Graeff-Teixeira C. Interface Molecules of *Angiostrongylus cantonensis*: Their Role in Parasite Survival and Modulation of Host Defenses. *Int J Inflamm* [Internet]. 2012 [citado 20 de noviembre de 2019];2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321291/>
113. Ansdell V, Kramer KJ, McMillan JK, Gosnell WL, Murphy GS, Meyer BC, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroangiostrongyliasis: updated recommendations. *Parasitology*. febrero de 2021;148(2):227-33.
114. Wilkins PP, Qvarnstrom Y, Whelen AC, Saucier C, da Silva AJ, Eamsobhana P. The current status of laboratory diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infections in humans using serologic and molecular methods. *Hawaii J Med Public Health*. junio de 2013;72(6 Suppl 2):55-7.
115. Shen HC, Chao CM, Hsieh CF. Brain Worms with Cerebrospinal Fluid Eosinophilia. *Am J Trop Med Hyg*. 6 de diciembre de 2017;97(6):1633-4.
116. Rai S, Madi D, Pai S, Baliga S. Unusual Larva in the CSF and Unique MRI Findings in a Case of Eosinophilic Meningitis. *J Clin Imaging Sci* [Internet]. 31 de diciembre de 2014 [citado 5 de octubre de 2022];4:76. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286823/>
117. Kuberski T, Wallace GD. Clinical manifestations of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. *Neurology*. diciembre de 1979;29(12):1566-70.
118. Mahajan RK, Almeida AJ, Sengupta SR, Renapurkar DM. Seasonal intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in the intermediate host, *Laevicaulis alte*. *Int J Parasitol*. agosto de 1992;22(5):669-71.
119. Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres E JL, Caldeira R, Carvalho OS, et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Trop*. septiembre de 2010;115(3):194-9.
120. Coaglio AL, Mozzer LR, Corrêa DN, Pereira CA de J, Lima W dos S. EVALUATION OF TECHNIQUES FOR RECOVERY OF *Angiostrongylus vasorum* FROM *Achatina fulica*, A POTENTIAL INTERMEDIATE HOST. *Rev Patol Trop / J Trop Pathol*. 25 de febrero de 2016;45(1):87-97.
121. Ash LR. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J Parasitol*. abril de 1970;56(2):249-53.
122. Qvarnstrom Y, Bishop HS, da Silva AJ. Detection of Rat Lungworm in Intermediate, Definitive, and Paratenic Hosts Obtained from Environmental Sources. *Hawaii J Med Public Health*. junio de 2013;72(6 Suppl 2):63-9.
123. Vitta A. Diagnosis of human angiostrongyliasis. 2012;6(2):10.

124. Graeff-Teixeira C, Aramburu da Silva AC, Yoshimura K. Update on Eosinophilic Meningoencephalitis and Its Clinical Relevance. *Clin Microbiol Rev* 2009. 22(2):322-48.
125. Maleewong W, Sombatsawat P, Intapan PM, Wongkham C, Chotmongkol V. Immunoblot evaluation of the specificity of the 29-kDa antigen from young adult female worms *Angiostrongylus cantonensis* for immunodiagnosis of human angiostrongyliasis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* diciembre de 2001;19(4):267-73.
126. Nuamtanong S. The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* junio de 1996;27(2):291-6.
127. Morassutti AL, Rascoe LN, Handali S, DA Silva AJ, Wilkins PP, Graeff-Teixeira C. Cross-reactivity of the 31 kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* - Dealing with the immunodiagnosis of meningoencephalitis. *Parasitology.* 2017;144(4):459-63.
128. Vitta A, Dekumyoy P, Komalamisra C, Kalambaheti T. Cloning and expression of a 16-kDa recombinant protein from *Angiostrongylus cantonensis* for use in immunoblot diagnosis of human angiostrongyliasis. - PubMed - NCBI [Internet]. 2016 [citado 12 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27406573>
129. Eamsobhana P, Gan XX, Ma A, Wang Y, Wanachiwanawin D, Yong HS. Dot immunogold filtration assay (DIGFA) for the rapid detection of specific antibodies against the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) using purified 31-kDa antigen. *J Helminthol.* diciembre de 2014;88(4):396-401.
130. Eamsobhana P, Yoolek A, Suvouttho S, Suvouttho S. Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrongylus cantonensis* antigen by electroelution from SDS-polyacrylamide gels. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* junio de 2001;32(2):308-13.
131. Chye SM, Lin SR, Chen YL, Chung LY, Yen CM. Immuno-PCR for Detection of Antigen to *Angiostrongylus cantonensis* Circulating Fifth-Stage Worms. *Clin Chem.* 1 de enero de 2004;50(1):51-7.
132. Intapan PM, Maleewong W, Polsan Y, Sawanyawisuth K, Chotmongkol V. Specific IgG antibody subclasses to *Angiostrongylus cantonensis* in patients with angiostrongyliasis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* diciembre de 2002;20(4):235-40.
133. Intapan PM, Maleewong W, Sawanyawisuth K, Chotmongkol V. Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of angiostrongyliasis. *Parasitol Res.* abril de 2003;89(6):425-9.
134. Chye SM, Chang JH, Yen CM. Immunodiagnosis of human eosinophilic meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L5 with molecular weight 204 kD. *Acta Trop.* 25 de febrero de 2000;75(1):9-17.

135. Huang DN, Chen MX, Geng YJ, Li X heng. Detection of circulating antigen of *Angiostrongylus cantonensis* by 12D5 and 21B7 monoclonal antibodies. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. enero de 2010;31(1):79-82.
136. Eamsobhana P, Mak JW, Yong HS. Detection of circulating antigens of *Parastrongylus cantonensis* in human sera by sandwich ELISA with specific monoclonal antibody. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28 Suppl 1:139-42.
137. Chen MX, Zhang RL, Chen JX, Chen SH, Li XH, Gao ST, et al. Monoclonal antibodies against excretory/secretory antigens of *Angiostrongylus cantonensis*. *Hybridoma (Larchmt)*. octubre de 2010;29(5):447-52.
138. Eamsobhana P, Yoolek A, Punthuprapasa P, Suvouttho S. A dot-blot ELISA comparable to immunoblot for the specific diagnosis of human parastrongyliasis. *J Helminthol*. diciembre de 2004;78(4):287-91.
139. Chen MX, Chen JX, Chen SH, Huang DN, Ai L, Zhang RL. Development of Lateral Flow Immunoassay for Antigen Detection in Human *Angiostrongylus cantonensis* Infection. *Korean J Parasitol [Internet]*. junio de 2016 [citado 5 de octubre de 2022];54(3):375-80. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4977790/>
140. Eamsobhana P, Gan XX, Ma A, Wang Y, Wanachiwanawin D, Yong HS. Dot immunogold filtration assay (DIGFA) for the rapid detection of specific antibodies against the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) using purified 31-kDa antigen. *J Helminthol*. diciembre de 2014;88(4):396-401.
141. Eamsobhana P, Tungtrongchitr A, Wanachiwanawin D, Yong HS. Immunochromatographic test for rapid serological diagnosis of human angiostrongyliasis. *Int. J. Infect. Dis*. 1 de agosto de 2018;73:69-71.
142. Eamsobhana P, Prasartvit A, Yong H, Tungtrongchitr A, Wanachiwanawin D, Desk S. Evaluation of a user-friendly test device ( Ac Quick Dx ) for detection of specific antibodies to human angiostrongyliasis. En 2019.
143. Somboonpatarakun C, Intapan PM, Sadaow L, Rodpai R, Sanpool O, Maleewong W. Development of an immunochromatographic device to detect antibodies for rapid diagnosis of human angiostrongyliasis. *Parasitology*. febrero de 2020;147(2):194-8.
144. de Melo LCV, de Souza FCR, Baccin A de O, da Mota DJG, Pereira-Chiocola VL, Pinto PLS. Immunoanalysis of different antigenic preparations of *Angiostrongylus cantonensis* for neuroangiostrongyliasis diagnosis improvement. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 3 de octubre de 2022;117:e220086.
145. Caldeira RL, Carvalho OS, Mendonça CL, Graeff-Teixeira C, Silva MC, Ben R, et al. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. diciembre de 2003;98(8):1039-43.

146. Qvarnstrom Y, Sullivan JJ, Bishop HS, Hollingsworth R, da Silva AJ. PCR-Based Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in Tissue and Mucus Secretions from Molluscan Hosts. *Appl Environ Microbiol.* marzo de 2007;73(5):1415-9.
147. Tavares R, Staggemeier R, Borges A, Rodrigues M, Castelan L, Vasconcelos J. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2011;17(3):239-48.
148. Eamsobhana P, Wanachiwanawin D, Dechkum N, Parsartvit A, Yong HS. Molecular diagnosis of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) by polymerase chain reaction-DNA sequencing of cerebrospinal fluids of patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* febrero de 2013;108(1):116-8.
149. Morassutti AL, Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* julio de 2014;109(4):399-407.
150. Qvarnstrom Y, Xayavong M, da Silva ACA, Park SY, Whelen AC, Calimlim PS, et al. Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of *Angiostrongylus cantonensis* DNA in Cerebrospinal Fluid from Patients with Eosinophilic Meningitis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(1):176-81.
151. Frey KG, Bishop-Lilly KA. Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection and Identification. En: *Methods in Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 20 de enero de 2020]. p. 525-54. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0580951715000136>
152. Xie M, Zhou Z, Guo S, Li Z, Zhao H, Deng J. Next-generation sequencing specifies *Angiostrongylus eosinophilic* meningoencephalitis in infants: Two case reports. *Medicine (Baltimore).* agosto de 2019;98(35):e16985.
153. Feng L, Zhang A, Que J, Zhou H, Wang H, Guan Y, et al. The metagenomic next-generation sequencing in diagnosing central nervous system angiostrongyliasis: a case report. *BMC Infect Dis.* 21 de septiembre de 2020;20(1):691.
154. Liu J, Tao J, Chen W, Wang T, Chen X, Shen M, et al. The application of metagenomic next-generation sequencing for *Angiostrongylus eosinophilic* meningitis in a pediatric patient: A case report. *Front Public Health* [Internet]. 2022 [citado 12 de diciembre de 2022];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2022.1003013>
155. Sears WJ, Qvarnstrom Y, Dahlstrom E, Snook K, Kaluna L, Baláz V, et al. AcanR3990 qPCR: A Novel, Highly Sensitive, Bioinformatically-Informed Assay to Detect *Angiostrongylus cantonensis* Infections. *Clin Infect Dis.* 5 de octubre de 2021;73(7):e1594-600.
156. Sears WJ, Qvarnstrom Y, Nutman TB. RPAcan3990: an Ultrasensitive Recombinase Polymerase Assay To Detect *Angiostrongylus cantonensis* DNA. *J Clin Microbiol.* 18 de agosto de 2021;59(9):e0118521.

157. Boonroumkaew P, Sanguansak T, Visaetsilpanonta S, Sanpool O, Sadaow L, Intapan PM, et al. Two Ocular Angiostrongyliasis Cases in Thailand with Molecular Identification of Causative Parasite Species. *Am J Trop Med Hyg.* junio de 2020;102(6):1399-403.
158. Liu CY, Song HQ, Zhang RL, Chen MX, Xu MJ, 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.* agosto de 2011;25(4):164-7.
159. Jarvi SI, Farias MEM, Howe K, Jacquier S, Hollingsworth R, Pitt W. Quantitative PCR estimates *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm) infection levels in semi-slugs (*Parmarion martensi*). *Mol Biochem Parasitol.* octubre de 2012;185(2):174-6.
160. Ke Y kun, Huang Y, Ge X qing, Peng M xian, Wang Q, Huang L ren, et al. [Detection of *Angiostrongylus cantonensis* larvae with a high resolution melt PCR assay]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* diciembre de 2014;32(6):452-4.
161. Fang W, Wang J, Liu J, Xu C, Cai W, Luo D. PCR assay for the cell-free copro-DNA detection of *Angiostrongylus cantonensis* in rat faeces. *Vet Parasitol.* 10 de febrero de 2012;183(3-4):299-304.
162. Jarvi SI, Pitt WC, Farias ME, Shiels L, Severino MG, Howe KM, et al. Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in the Blood and Peripheral Tissues of Wild Hawaiian Rats (*Rattus rattus*) by a Quantitative PCR (qPCR) Assay. *PLoS ONE.* 2015;10(4):e0123064.
163. Yang B, Yang L, Chen Y, Lu G. Magnetic resonance imaging findings and clinical manifestations in cerebral angiostrongyliasis from Dali, China. *Brain Behav* [Internet]. 17 de julio de 2019 [citado 18 de noviembre de 2019];9(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6710201/>
164. Kanpittaya J, Jitpimolmard S, Tiamkao S, Mairiang E. MR findings of eosinophilic meningoencephalitis attributed to *Angiostrongylus cantonensis*. *AJNR Am J Neuroradiol.* julio de 2000;21(6):1090-4.
165. Shyu LY, Tsai HH, Lin DP, Chang HH, Tyan YS, Weng JC. An 8-week brain MRI follow-up analysis of rat eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Zoonoses Public Health.* septiembre de 2014;61(6):411-9.
166. McCormick GF, Zee CS, Heiden J. Cysticercosis cerebri. Review of 127 cases. *Arch Neurol.* septiembre de 1982;39(9):534-9.
167. Bahr NC, Trotman RL, Samman H, Jung RS, Rosterman LR, Weil GJ, et al. Eosinophilic Meningitis Due to Infection With *Paragonimus kellyi*. *Clin Infect Dis.* 1 de mayo de 2017;64(9):1271-4.
168. Hwang KP, Chen ER. Clinical studies on angiostrongyliasis cantonensis among children in Taiwan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* diciembre de 1991;22 Suppl:194-9.

169. Madariaga MG, Cachay ER, Zarlenga DS. A probable case of human neurotrichinellosis in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* agosto de 2007;77(2):347-9.
170. Vidal JE, Sztajnbok J, Seguro AC. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg.* septiembre de 2003;69(3):341-3.
171. Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GDD. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol.* 2009;18(22):4541-50.
172. Blouin MS. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol.* 1 de mayo de 2002;32(5):527-31.
173. Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Sadaow L, Laymanivong S, et al. *Angiostrongylus cantonensis* and *A. malaysiensis* Broadly Overlap in Thailand, Lao PDR, Cambodia and Myanmar: A Molecular Survey of Larvae in Land Snails. *PLoS ONE.* 2016;11(8):e0161128.
174. Varela-M RE, Arias JS, Velásquez LE. 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):111-9.
175. Lv S, Zhang Y, Steinmann P, Utzinger J, Zhou XN. The genetic variation of *Angiostrongylus cantonensis* in the People's Republic of China. *Infect Dis Poverty.* 1 de septiembre de 2017;6:125.
176. Liu CY, Zhang RL, Chen MX, li J, Ai L, Wu CY, et al. Characterisation of *Angiostrongylus cantonensis* Isolates from China by Sequences of Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA. *J Anim Vet Adv.* 1 de mayo de 2011;10:593-6.
177. Peng J, He ZP, Zhang S, Lun ZR, Wu ZD, Fan CK, et al. Phylogeography of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) in southern China and some surrounding areas. *PLoS Negl Trop Dis.* agosto de 2017;11(8):e0005776.
178. Fontanilla IKC, Wade CM. The small subunit (SSU) ribosomal (r) RNA gene as a genetic marker for identifying infective 3rd juvenile stage *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop.* febrero de 2008;105(2):181-6.
179. Eamsobhana P, Lim PE, Yong HS. Phylogenetics and systematics of *Angiostrongylus* lungworms and related taxa (Nematoda: Metastrongyloidea) inferred from the nuclear small subunit (SSU) ribosomal DNA sequences. *J Helminthol.* mayo de 2015;89(3):317-25.
180. Dumidae A, Janthu P, Subkrasae C, Dekumyoy P, Thanwisai A, Vitta A. Genetic characterization of *Angiostrongylus* larvae and their intermediate host, *Achatina fulica*, in Thailand. *PLoS One* [Internet]. 27 de septiembre de 2019 [citado 13 de

diciembre de 2019];14(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6764694/>

181. Blasco-Costa I, Cutmore SC, Miller TL, Nolan MJ. Molecular approaches to trematode systematics: ‘best practice’ and implications for future study. *Syst Parasitol* [Internet]. 1 de marzo de 2016 [citado 6 de diciembre de 2022];93(3):295-306. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9631-2>
182. Dorris M, De Ley P, Blaxter ML. Molecular Analysis of Nematode Diversity and the Evolution of Parasitism. *Parasitol Today* [Internet]. 1 de mayo de 1999 [citado 6 de diciembre de 2022];15(5):188-93. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475899014398>
183. Gissi C, Iannelli F, Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*. octubre de 2008;101(4):301-20.
184. Dumidae A, Subkrasae C, Ardpairin J, Thanwisai A, Vitta A. Genetic analysis of a 66-kDa protein-encoding gene of *Angiostrongylus cantonensis* and *Angiostrongylus malaysiensis*. *Parasitology*. enero de 2023;150(1):98-114.
185. Apichat V, Narongrit S, Jittranuch T, Anucha W, Wilaiwan P, Chamaiporn F, et al. PHYLOGENY OF *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* IN THAILAND BASED ON CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT I GENE SEQUENCE. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. mayo de 2016;47(3):377-86.
186. Tokiwa T, Harunari T, Tanikawa T, Komatsu N, Koizumi N, Tung KC, et al. Phylogenetic relationships of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages. *Parasitol Int*. septiembre de 2012;61(3):431-6.
187. Monte TC, Simões RO, Oliveira APM, Novaes CF, Thiengo SC, Silva AJ, et al. Phylogenetic relationship of the Brazilian isolates of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) employing mitochondrial COI gene sequence data. *Parasit Vectors*. 6 de noviembre de 2012;5:248.
188. Eamsobhana P, Song SL, Yong HS, Prasartvit A, Boonyong S, Tungtrongchitr A. Cytochrome c oxidase subunit I haplotype diversity of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Acta Trop*. julio de 2017;171:141-5.
189. Seddigh S, Darabi M. Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects. *Mitochondrial DNA Part A*. 17 de febrero de 2018;29(2):236-49.
190. Gao J, Yue LL, Jiang X, Ni L, Ashraf MA, Zhou Y, et al. Phylogeographic Patterns of *Microtus fortis* (Arvicolinae: Rodentia) in China Based on Mitochondrial DNA Sequences. *PJZ*. 12 de junio de 2017;49(4):1185-95.
191. Dusitsittipon S, Thaenkham U, Watthanakulpanich D, Adisakwattana P, Komalamisra C. Genetic differences in the rat lungworm, *Angiostrongylus*

- cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae), in Thailand. J Helminthol. septiembre de 2015;89(5):545-51.
192. Yong HS, Eamsobhana P, Song SL, Prasartvit A, Lim PE. Molecular phylogeography of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) and genetic relationships with congeners using cytochrome b gene marker. Acta Tro. 1 de agosto de 2015;148:66-71.
  193. CDC. Epidemiology & Risk Factors. 2018.
  194. Rodríguez Pérez M, González López ME, Cañete Villafranca R, Espinosa Triana D. Resultados de una intervención educativa sobre parasitismo intestinal en personal médico. Rev Cuba de Medicina Mil. marzo de 2016;45(1):40-52.
  195. Fonte Galindo L, Ali Almannoni S, MonzoteLópez A, Fonte Galindo O, Sánchez Valdés L. Intervención para mejorar conocimientos, percepciones y prácticas en relación con el diagnóstico, tratamiento y control de la giardiasis. Rev Cubana Med Trop. septiembre de 2013;65(3):297-308.
  196. Cowie RH. *Angiostrongylus cantonensis*: Agent of a Sometimes Fatal Globally Emerging Infectious Disease (Rat Lungworm Disease). ACS Chem Neurosci. 18 de 2017;8(10):2102-4.
  197. Pang L, Coppolo C, Hauptman S. An Effective Barrier to Prevent Crop Contamination by Slug Vectors of *Angiostrongylus cantonensis*. Am J Trop Med Hyg. junio de 2022;106(6):1678-83.
  198. Roda A, Yong Cong M, Donner B, Dickens K, Howe A, Sharma S, et al. Designing a trapping strategy to aid Giant African Snail (*Lissachatina fulica*) eradication programs. PLoS One. 7 de septiembre de 2018;13(9):e0203572.
  199. CABI. *Achatina achatina*. CABI Compendium. 7 de enero de 2022;CABI Compendium:72235390.
  200. York EM, Butler CJ, Lord WD. Global Decline in Suitable Habitat for *Angiostrongylus* (= *Parastrongylus*) *cantonensis*: The Role of Climate Change. PLoS One. 14 de agosto de 2014;9(8):e103831.
  201. Aekphachaisawat N, Sawanyawisuth K, Khamsai S, Boonsawat W, Tiamkao S, Limpawattana P, et al. A national surveillance of eosinophilic meningitis in Thailand. Parasite Epidemiol Control. noviembre de 2022;19:e00272.
  202. Prevention CC for DC and. CDC - *Angiostrongylus* - Resources for Health Professionals [Internet]. 2019 [citado 9 de enero de 2020]. Disponible en: [https://www.cdc.gov/parasites/angiostrongylus/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/angiostrongylus/health_professionals/index.html)
  203. Chotmongkol V, Sawanyawisuth K, Thavornpitak Y. Corticosteroid treatment of eosinophilic meningitis. Clin Infect Dis. septiembre de 2000;31(3):660-2.
  204. Sawanyawisuth K, Limpawattana P, Busaracome P, Ninpaitoon B, Chotmongkol V, Intapan PM, et al. A 1-week course of corticosteroids in the treatment of eosinophilic meningitis. Am J Med. 15 de noviembre de 2004;117(10):802-3.

205. Chotmongkol V, Sawadpanitch K, Sawanyawisuth K, Louhawilai S, Limpawattana P. Treatment of eosinophilic meningitis with a combination of prednisolone and mebendazole. *Am J Trop Med Hyg.* junio de 2006;74(6):1122-4.
206. Feng F, Feng Y, Liu Z, Li WH, Wang WC, Wu ZD, et al. Effects of albendazole combined with TSII-A (a Chinese herb compound) on optic neuritis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in BALB/c mice. *Parasit Vectors.* 25 de noviembre de 2015;8:606.
207. Jitpimolmard S, Sawanyawisuth K, Morakote N, Vejjajiva A, Puntumetakul M, Sanchaisuriya K, et al. Albendazole therapy for eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res.* mayo de 2007;100(6):1293-6.
208. Jacob J, Tan G, Lange I, Saeed H, Date A, Jarvi S. *In vitro* efficacy of anthelmintics on *Angiostrongylus cantonensis* L3 larvae. *Parasitology.* febrero de 2021;148(2):240-50.
209. Berkhout A, Prociw P, Herbert A, Anthony LT, Nourse C. Two cases of neuroangiostrongyliasis: A rare disease because rarely considered or rarely diagnosed? *J Paediatr Child Health.* diciembre de 2019;55(12):1463-9.
210. Defo AL, Lachaume N, Cuadro-Alvarez E, Maniassom C, Martin E, Njuieyon F, et al. *Angiostrongylus cantonensis* Infection of Central Nervous System, Guiana Shield. *Emerging Infect Dis.* 2018;24(6):1153-5.
211. Tiwari US, Aishwarya A, Gandhi S, Sisodia P. *Angiostrongylus cantonensis* in anterior chamber. *Indian J Ophthalmol.* enero de 2019;67(1):158-60.
212. Censos IN de E y. División Político – Administrativa [Internet]. Instituto Nacional de Estadística y Censos. 2020 [citado 30 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/division-politico-administrativa/>
213. GAD Provincial de Napo [Internet]. [citado 22 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.napo.gob.ec/website/>
214. Muzzio J. Hospederos intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis* en Ecuador [Internet]. Editorial academica española; 2014 [citado 14 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.eae-publishing.com/catalog/details//store/gb/book/978-3-659-01021-7/hospederos-intermediarios-de-angiostrongylus-cantonensis-en-ecuador>
215. Paraense WL, Paraense WL. *Lymnaea cousini* Jousseau, 1887, from Ecuador (Gastropoda: Lymnaeidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* octubre de 1995;90(5):605-9.
216. Brockelman C, W C, V B. Growth and localization of *Angiostrongylus cantonensis* in the molluscan host, *Achatina fulica*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* [Internet]. marzo de 1976 [citado 25 de septiembre de 2022];(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1027104/>

217. Sithithaworn P. Transmission of *Angiostrongylus cantonensis* through the giant African snail *Achatina fulica*: an experimental study. Southeast Asian J Trop Med Public Health [Internet]. 1 de enero de 1991 [citado 25 de septiembre de 2022]; Disponible en: [https://www.academia.edu/65042048/Transmission\\_of\\_Angiostrongylus\\_cantonensis\\_through\\_the\\_giant\\_African\\_snail\\_Achatina\\_fulica\\_an\\_experimental\\_study](https://www.academia.edu/65042048/Transmission_of_Angiostrongylus_cantonensis_through_the_giant_African_snail_Achatina_fulica_an_experimental_study)
218. Wallace GD, Rosen L. Studies on eosinophilic meningitis. IV. Experimental infection of fresh-water and marine fish with *Angiostrongylus cantonensis*. Am J Epidemiol. mayo de 1967;85(3):395-402.
219. Lv S, Zhang Y, Liu HX, Zhang CW, Steinmann P, Zhou XN, et al. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. Parasitol Res. mayo de 2009;104(6):1351-9.
220. Ash LR. Diagnostic Morphology of the Third-Stage Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). J Parasitol. abril de 1970;56(2):249.
221. Reiczigel J, Marozzi M, Fábíán I, Rózsa L. Biostatistics for Parasitologists – A Primer to Quantitative Parasitology. Trends Parasitol [Internet]. abril de 2019 [citado 22 de febrero de 2022];35(4):277-81. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492219300157>
222. Córdoba R D, Patiño Montoya A, Giraldo A. Prevalencia de parásitos nematodos Strongylidos asociados al Caracol africano, *Achatina fulica*, en el Valle del Cauca, Colombia. Rev MVZ Córdoba. 3 de septiembre de 2017;6276-86.
223. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. J Parasitol [Internet]. 1997 [citado 5 de octubre de 2022];83(4):575-83. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/3284227>
224. Yong HS, Eamsobhana P, Song SL, Prasartvit A, Lim PE. Molecular phylogeography of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) and genetic relationships with congeners using cytochrome b gene marker. Acta Trop. agosto de 2015;148:66-71.
225. Eamsobhana P, Yong HS, Song SL, Gan XX, Prasartvit A, Tungtrongchitr A. Molecular phylogeography and genetic diversity of *Angiostrongylus cantonensis* and *A. malaysiensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) based on 66-kDa protein gene. Parasitol Int. febrero de 2019;68(1):24-30.
226. Chan AHE, Chaisiri K, Dusitsittipon S, Jakkul W, Charoennitiwat V, Komalamisra C, et al. Mitochondrial ribosomal genes as novel genetic markers for discrimination of closely related species in the *Angiostrongylus cantonensis* lineage. Acta Trop. noviembre de 2020;211:105645.
227. Lv S, Zhang Y, Steinmann P, Utzinger J, Zhou XN. The genetic variation of *Angiostrongylus cantonensis* in the People's Republic of China. Infect Dis

- Poverty [Internet]. 1 de septiembre de 2017 [citado 20 de mayo de 2020];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5579933/>
228. Legislation for the protection of animals used for scientific purposes - Environment - European Commission [Internet]. [citado 29 de octubre de 2020]. Disponible en: [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm)
229. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 15 de junio de 2012;28(12):1647-9.
230. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, editor. *Mol Biol Evol*. 1 de junio de 2018;35(6):1547-9.
231. Eamsobhana P, Lim PE, Zhang H, Gan X, Yong HS. Molecular differentiation and phylogenetic relationships of three *Angiostrongylus* species and *Angiostrongylus cantonensis* geographical isolates based on a 66-kDa protein gene of *A. cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Exp Parasitol*. 1 de diciembre de 2010;126(4):564-9.
232. Arenas M. Trends in substitution models of molecular evolution. *Front Genet*. 2015;6:319.
233. Lemoine F, Domelevo Entfellner JB, Wilkinson E, Correia D, Dávila Felipe M, De Oliveira T, et al. Renewing Felsenstein's Phylogenetic Bootstrap in the Era of Big Data. *Nature*. abril de 2018;556(7702):452-6.
234. Sullivan GM, Artino AR. Analyzing and Interpreting Data From Likert-Type Scales. *J Grad Med Educ*. diciembre de 2013;5(4):541-2.
235. Gliem J.A. and Gliem R.R. Calculating, Interpreting, and Reporting Cronbach's Alpha Reliability Coefficient for Likert-Type Scales. *Midwest Research to Practice Conference in Adult, Continuing, and Community Education*, Columbus, 2003, 82-88.
236. Software SPSS - España | IBM [Internet]. [citado 10 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.ibm.com/es-es/analytics/spss-statistics-software>
237. Barrios U, Diéguez-Fernández L. Presencia y distribución de hospederos intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis* en camaguey. Prevalencia e importancia epidemiológica para su control. *Arch méd Camagüey*. 1 de febrero de 2004;8.
238. Shan, Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, et al. Invasive Snails and an Emerging Infectious Disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Negl Trop Dis*. 10 de febrero de 2009;3(2):e368.

239. Huang D, Huang Y, Tang Y, Zhang Q, Li X, Gao S, et al. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* Infection Status in Host Animals and Populations in Shenzhen, 2016-2017. *Vector Borne Zoonotic Dis.* octubre de 2019;19(10):717-23.
240. Vitta A, Polseela R, Nateeworanart S, Tattiyapong M. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. *Asian Pac J Trop Med.* 1 de agosto de 2011;4:597-9.
241. Vitta A, Polsut W, Fukruksa C, Yimthin T, Thanwisai A, Dekumyoy P. Levels of infection with the lungworm *Angiostrongylus cantonensis* in terrestrial snails from Thailand, with *Cryptozona siamensis* as a new intermediate host. *J Helminthol.* noviembre de 2016;90(6):737-41.
242. Oliveira AP, Gentile R, Maldonado Júnior A, Lopes Torres EJ, Thiengo SC, Oliveira AP, et al. *Angiostrongylus cantonensis* infection in molluscs in the municipality of São Gonçalo, a metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil: role of the invasive species *Achatina fulica* in parasite transmission dynamics. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* septiembre de 2015;110(6):739-44.
243. Bechara AH, Simões RO, Faro MJ, Garcia JS. *Achatina fulica* infected by *Angiostrongylus cantonensis* on beaches, in the west zone of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet].* 15 de febrero de 2018 [citado 20 de enero de 2021];60. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5813667/>
244. Cawas JR, Quisao CJT, Castillo DSC, Pornobi KO. Prevalence of *Angiostrongylus cantonensis* among different species of snails in the village of Bagong Sikat Muñoz, Nueva Ecija, Philippines and its associated risk factors for zoonotic transmission. *J Parasit Dis.* junio de 2020;44(2):388-94.
245. Sánchez Amador Ivan. Prevalencia del nematodo *Angiostrongylus cantonensis* en el huésped intermediario caracol gigante africano (*Achatina fulica*), en el período 2012 y 2013 en varios sectores de la ciudad de Guayaquil, Ecuador [Internet] [Thesis]. Universidad de Guayaquil; Facultad de Ciencias Naturales; 2014 [citado 11 de enero de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/7166>
246. Rollins RL, Cowie RH, Echaluse MV, Medeiros MCI. Host snail species exhibit differential *Angiostrongylus cantonensis* prevalence and infection intensity across an environmental gradient. *Acta Trop.* 7 de enero de 2021;105824.
247. Clima Provincia de Napo: Climograma, Temperatura y Tabla climática para Provincia de Napo - Climate-Data.org [Internet]. [citado 7 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://es.climate-data.org/america-del-sur/ecuador/provincia-de-napo-58/>
248. Crowl TA, Crist TO, Parmenter RR, Belovsky G, Lugo AE. The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Front. Ecol. Environ.* 2008;6(5):238-46.

249. Simberloff D, Martin JL, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, et al. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends Ecol Evol.* enero de 2013;28(1):58-66.
250. Wu X, Lu Y, Zhou S, Chen L, Xu B. Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. *Environ Int.* 1 de enero de 2016;86:14-23.
251. Paradis E. Analysis of haplotype networks: The randomized minimum spanning tree method. *Methods Ecol. Evol.* 2018;9(5):1308-17.
252. Monte TCC, Gentile R, Garcia J, Mota E, Santos JN, Maldonado Júnior A. Brazilian *Angiostrongylus cantonensis* haplotypes, ac8 and ac9, have two different biological and morphological profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* diciembre de 2014;109(8):1057-63.
253. Červená B, Modrý D, Fecková B, Hrazdilová K, Foronda P, Alonso AM, et al. Low diversity of *Angiostrongylus cantonensis* complete mitochondrial DNA sequences from Australia, Hawaii, French Polynesia and the Canary Islands revealed using whole genome next-generation sequencing. *Parasites Vectors.* 16 de mayo de 2019;12(1):241.
254. Eamsobhana P, Song SL, Yong HS, Prasartvit A, Boonyong S, Tungtrongchitr A. Cytochrome c oxidase subunit I haplotype diversity of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Acta Trop.* 1 de julio de 2017;171:141-5.
255. Delgado-Serra S, Sola J, Negre N, Paredes-Esquivel C. *Angiostrongylus cantonensis* Nematode Invasion Pathway, Mallorca, Spain. *Emerg Infect Dis.* junio de 2022;28(6):1163-9.
256. Moreira Perdomo Y, Fong González A, Domenech Cañete I, Hernández Barrios Y, Baldrich Álvarez J, Sollet Céspedes Y, et al. Conocimientos, percepciones y prácticas en relación con las geohelmintosis. *Rev Cubana Med Trop.* diciembre de 2017;69(3):1-15.
257. Pérez MR, López MEG, Cañete R, Triana DE. Resultados de una intervención educativa sobre parasitismo intestinal en personal médico. *Rev Cuba de Medicina Mil.* 45 (1), 40-52.
258. Batista Rojas O, Martínez Sánchez R. Intervención comunitaria en las parasitosis intestinales parroquia Santa Bárbara, estado Anzoátegui, 2010. *Rev Habanera de Cienc Médicas.* junio de 2011;10(2):0-0.
259. Martini L. Diseño de un programa de control y prevención de *Angiostrongylus cantonensis* en el Ecuador período 2008-2009 [Maestría en Gerencia Hospitalaria]. [Guayaquil, Ecuador]: Universidad Estatal de Guayaquil; 2011.
260. Herrera D, Simón F, Venanzi M. Nuevos retos en salud pública: la vigilancia sindrómica como una nueva forma de vigilancia epidemiológica. *Gaceta Sanitaria - GAC SANIT.* 31 de enero de 2006;20:78-9.

261. Meléndez RD. Trends in teaching parasitology: where to complain? Trends Parasitol. septiembre de 2003;19(9):387.
262. Acholonu ADW. Trends in teaching parasitology: the American situation. Trends Parasitol. enero de 2003;19(1):6-9.
263. Blanco VC, Romero M del CS, Gómez YM del C, Boué LME, Torres FDG. Intervención educativa al personal médico y paramédico sobre *Inermicapsifer madagascariensis*. Rev Inf Cient. 2015;90(2):270-8.
264. Fonte Galindo L, Ali Almannoni S, MonzoteLópez A, Fonte Galindo O, Sánchez Valdés L. Intervención para mejorar conocimientos, percepciones y prácticas en relación con el diagnóstico, tratamiento y control de la giardiasis. Rev Cubana Med Tropical. septiembre de 2013;65(3):297-308.
265. Fonte Galindo L, Almannoni SA, Monzote López A. Acerca de una intervención para atenuar insuficiencias cognoscitivas, percepciones incorrectas y prácticas inadecuadas en relación con giardiasis. Rev. Cuba. Med. Gen. Integral. marzo de 2010;26(1).
266. Nazaré-Pembele G, Rojas L, Núñez FÁ. Lack of knowledge regarding the microscopic diagnosis of malaria by technicians of the laboratory network in Luanda, Angola. Biomedica [Internet]. 1 de marzo de 2016 [citado 12 de septiembre de 2022];36(1):149-55. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2623>
267. Mena-Tudela D, González-Chordá VM, Cervera-Gasch A, Maciá-Soler ML, Orts-Cortés MI, Mena-Tudela D, et al. Eficacia de una intervención educativa de Práctica Basada en la Evidencia en estudiantes de segundo año de enfermería. Rev. Latino-Am. Enfermagem [Internet]. 2018 [citado 6 de febrero de 2020];26. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0104-11692018000100340&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0104-11692018000100340&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
268. Bruschi F. How parasitology is taught in medical faculties in Europe? Parasitology, lost? Parasitol Res. noviembre de 2009;105(6):1759-62.
269. Cowie RH, Ansdell V, Panosian Dunavan C, Rollins RL. Neuroangiostrongyliasis: Global Spread of an Emerging Tropical Disease. Am J Trop Med Hyg. 7 de noviembre de 2022; tpm220360.

# **ANEXOS**

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Encuesta a profesionales sobre angiostrongiliasis

**Nombre:** \_\_\_\_\_ **Fecha** \_\_\_\_\_

**Centro de Salud:** \_\_\_\_\_

#### Generalidades

1. La angiostrongiliasis, producida por *Angiostrongylus cantonensis*, es una enfermedad de etiología.

- Bacteriana
- Viral
- Parasitaria
- Micótica
- No es una enfermedad infecciosa.

2. Desde el punto de vista geográfico, la angiostrongiliasis, producida por *A. cantonensis*, es una enfermedad que afecta fundamentalmente a:

- Países del continente africano.
- Países del continente europeo.
- Predomina en sureste asiático.
- Países del continente americano.
- Esta enfermedad predomina en cualquier lugar del mundo.

3. La vía principal por la cual se adquiere la angiostrongiliasis es a través de:

- Ingestión de carnes crudas.
- Ingestión de aguas contaminadas.
- Por transfusiones de sangre.
- Ingestión de moluscos y caracoles crudos.
- Por relaciones sexuales sin protección.

#### Ciclo de vida

4. Los hospederos definitivos habituales de *A. cantonensis* son:

- Caracoles y moluscos de agua dulce.
- Ratas y otros roedores.
- Los seres humanos.
- Perros gatos y otros animales mamíferos.
- Peces y langostinos de agua dulce.

5. Los hospederos intermediarios habituales de *A. cantonensis* son:

- Diferentes especies de plantas acuáticas.

- Los seres humanos.
- Ratas y otros roedores.
- Perros gatos y otros mamíferos.
- Diferentes tipos de moluscos y caracoles.

6. *Angiostrongylus cantonensis* en su forma adulta se localiza preferentemente en:

- Pulmones de la rata y otros roedores
- Pulmones de los seres humanos
- Intestinos de los seres humanos
- Cerebro de los seres humanos
- En ninguna de las localizaciones anteriores.

7. *Angiostrongylus cantonensis* en su forma larvaria se localiza preferentemente en:

- Pulmones de la rata y otros roedores.
- Pulmones de los seres humanos.
- Intestinos de los seres humanos.
- Cerebro de los seres humanos.
- En ninguna de las localizaciones anteriores.

8. En la infección producida por *Angiostrongylus cantonensis* se consideran hospederos accidentales:

- Ratas y otros roedores.
- Peces y langostinos de agua dulce.
- El hombre y otros mamíferos.
- Caracoles y moluscos de agua dulce.
- Diferentes especies de plantas acuáticas.

9.Cuál es la forma infectante de *A. cantonensis* para el hombre:

- Larvas L1 que se encuentran en los hospederos definitivos.
- Larvas L3 que se encuentran en el tejido de los hospederos intermediarios.
- Larvas L5 que se encuentran en el hospedero definitivo y en el hospedero accidental.
- Huevos de *A. cantonensis* en el hospedero definitivo.
- Ninguna de las anteriores.

### **Manifestaciones clínicas**

10. Las manifestaciones clínicas más características de la angiostrongilosis, producida por *Angiostrongylus cantonensis* son:

- Meningitis, encefalitis y lesiones oculares con marcada eosinofilia.
- No se presentan manifestaciones oculares.
- Los casos que se presentan con encefalitis son muy frecuentes y siempre son fatales.
- La toma pulmonar es muy frecuente y produce síndrome de Loeffler.
- Todos los planteamientos anteriores son posibles.

11. El periodo de incubación de la angiostrongilosis, producida por *Angiostrongylus cantonensis* es en promedio de:
- 3 a 6 meses.
  - 6 meses a 1 año.
  - 1 a 3 semanas.
  - 1 a 3 días.
  - Menor a 24 horas
12. La mayor parte de las infecciones producida por *Angiostrongylus cantonensis*:
- Se resuelven espontáneamente sin tratamiento específico
  - Se convierte en una infección crónica que dura años.
  - Se convierte en una infección sistémica con compromiso multiorgánico
  - Produce tumoraciones en el parénquima cerebral
  - Ninguna de las anteriores
13. La enfermedad usualmente tiene una duración de:
- 1 semana.
  - 2 a 8 semanas.
  - 8-12 meses.
  - 3-7 días.
  - Ningunas de las anteriores.

### **Diagnóstico**

14. Actualmente el diagnóstico de la angiostrongiliasis en la República del Ecuador se basa en:
- La visualización del agente etiológico en muestras de sangre, orina y heces.
  - A través de la sintomatología clínica y antecedentes epidemiológicos.
  - La presencia de larvas de *A. cantonensis* en muestras de saliva.
  - La presencia de larvas de *A. cantonensis* en biopsias de piel.
  - Ninguno de los planteamientos anteriores es correcto.
15. El hallazgo de laboratorio más significativo en pacientes portadores de angiostrongiliasis consiste en :
- Cifras de hemoglobina notablemente disminuidas.
  - Aumento significativo de las transaminasas hepáticas.
  - Disminución de los niveles de glucosa en sangre.
  - Presencia de más de 10% de eosinófilos en el líquido cefalorraquídeo.
  - Presencia de abundantes plaquetas en el frotis de sangre periférica.
16. Con el empleo de métodos de diagnóstico indirecto para la angiostrongiliasis se conoce que:
- Los métodos de ELISA e inmunotransferencia tienen una sensibilidad media y baja especificidad.
  - La Tomografía Axial computarizada no tiene mucha utilidad.
  - La ecografía permite el diagnóstico.
  - Ninguno de los planteamientos anteriores son correctos.

17. El hallazgo de larvas en líquido cefalorraquídeo se da en:

- 50-60% de los casos.
- 80-60% de los casos.
- 1% de los casos.
- Nunca se encuentra en LCR.
- Ninguna de las anteriores.

### **Tratamiento**

18. La conducta más efectiva para el tratamiento de la angiostrongiliasis es:

- El uso de corticosteroides como terapia única y/o albendazol o mebendazol.
- Extracción quirúrgica del parásito.
- Ivermectina, dosis única.
- Se recomienda el uso de prednisolona por vía oral durante 12 meses.
- La mejor opción es utilizar antibióticos de amplio espectro durante 7 días.

19. En los pacientes que presenten daño ocular la mejor opción de tratamiento consiste en:

- Remoción quirúrgica del parásito intraocular.
- Terapia con láser retinal.
- Esteroides tópicos.
- Esteroides sistémicos acompañados de albendazol o mebendazol.
- Tratamiento sistémico solo con antihelmínticos en dosis elevadas.

### **Prevención**

20. Las principales medidas profilácticas para evitar contraer la enfermedad consisten en:

- Hervir el agua de consumo humano.
- Coccción adecuada de caracoles o moluscos antes de ser ingeridos.
- Disposición adecuada de residuos líquidos y sólidos en las comunidades.
- Examen adecuado de las donaciones de sangre antes de ser utilizadas.
- Todas las medidas anteriores son adecuadas para evitar contraer esta enfermedad.

21. Otras medidas profilácticas destinadas a impedir la infección incluyen:

- Uso de vacunas.
- Uso de antihelmínticos.
- Exámenes periódicos de heces.
- Detección de anticuerpos en el suero.
- Ninguna de las anteriores.

### **Percepción**

22. Cree usted que en la República del Ecuador la infección por *Angiostrongylus cantonensis* en humanos es:

- Causa muy frecuente de enfermedad.
- Causa poco frecuente de enfermedad.

Nunca se han presentado casos de enfermedad producida por este parásito.

23. Durante su formación como médico, los conocimientos impartidos sobre esta parasitosis para conocer su modo de transmisión, su diagnóstico, su tratamiento y prevención

Fueron suficientes.

Fueron insuficientes.

No se le proporcionó ninguna información sobre las enfermedades que produce.

### **Práctica**

24. Supongamos que es sábado y usted es un médico de atención primaria en Balzar y se presenta a su consulta un paciente con dolor de cabeza, náuseas, vómitos, dolores musculares y refiere haber comido caracoles crudos tres días previos, ¿cuál es su conducta?

Le administra tratamiento sintomático y lo envía a su casa.

Le ofrece una hoja de interconsulta para que vaya al hospital el día lunes al gastroenterólogo.

Lo envía inmediatamente al hospital más cercano.

25. Supongamos que usted es un médico del servicio de urgencias del Hospital de Tena y llega un paciente con cefalea, náuseas, vómitos, parestesia, disturbios visuales y antecedentes de haber ingerido caracoles crudos en los tres días previos, si usted sospecha de meningitis eosinofílica por *A. cantonensis*, ¿Qué exámenes solicitaría?

Búsqueda del parásito en LCR y conteo de eosinófilos, además de conteo de eosinófilos en sangre.

Examen de gota gruesa y frotis de sangre periférica.

Búsqueda del parásito en las deposiciones.

Hemocultivo.

Cultivo de orina.

FIRMA.....

CI.....

GRACIAS POR SU PARTICIPACION VOLUNTARIA

Anexo 2. Formato de consentimiento informado.

**CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL DE PARASITOLOGIA, INSTITUTO DE INVESTIGACION EN SALUD PUBLICA-INSPI**

Se me ha solicitado ofrecer mi consentimiento para que participe en el estudio de investigación intitulado “Evaluación sobre los conocimientos, percepciones y prácticas sobre angiostrongiliasis en médicos de atención primaria de tres cantones de la provincia Napo, República del Ecuador, antes y después de la intervención educativa.” El estudio de investigación incluirá un cuestionario de 25 preguntas de alternativas múltiples.

He leído la información previamente, de la cual tengo una copia. He tenido la oportunidad de realizar preguntas sobre la información ofrecida y cada pregunta que he hecho ha sido respondida para mi satisfacción. He tenido el tiempo suficiente para leer y comprender los riesgos y beneficios de mi participación y consiento voluntariamente participar en esta investigación.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

Nombre del investigador que obtiene el consentimiento: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

Anexo 3. Números de accesos de las secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad I determinadas en este estudio.

| <b>Identificación</b> | <b>Número de acceso.<br/>Banco de genes</b> | <b>Número del espécimen</b>  | <b>Fuente</b>                                     |
|-----------------------|---|------------------------------|---|
| LSA-01                | MW391020                                    | Esmeraldas_COI_CONTIG COI I  | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-02                | MW390970                                    | Santa Elena_COI_CONTIG COI I | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-03                | MW390971                                    | ElOro_COI_CONTIG COI I       | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-04                | MW390972                                    | Guayas_COI_CONTIG COI I      | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-05                | MW390967                                    | Zamora_COI_CONTIG COI I      | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-06                | MW390974                                    | Pastaza_COI_CONTIG COI I     | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-07                | MW390969                                    | Orellana_COI_CONTIG COI I    | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-08                | MW390973.1                                  | Manabi_COI_CONTIG COI I      | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-09                | MW390968                                    | Napo_COI_CONTIG COI I        | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-10                | MW390966                                    | Canar_COI_CONTIG COI I       | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| LSA-11                | MW390965                                    | Sucumbios_COI_CONTIG COI I   | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |

Anexo 4. Números de accesos de las secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica la *citocromo oxidasa* subunidad 1 de otras partes del mundo y utilizadas en el estudio de análisis filogenético.

| .  | Identificación                        | Número de acceso. Banco de genes | Número del espécimen | Fuente   |
|----|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------|--|
| 1  | Rio de Janeiro Brasil ac8             | JX471066.1                       | NA                   | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 2  | Belem do Para Brasil ac8              | JQ595406                         | CHIOC35738a          | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 3  | Espirito Santo Brasil ac8             | GU138111.1                       | 9663                 | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 4  | Sao Gonzalo Rio de Janeiro Brasil ac8 | JX471066                         | CHIOC 35703          | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 5  | Túnel Noel Rosa Brasil – RJ ac8       | JX471068                         | Chioc 35721          | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 6  | Marituba – Parana Brasil ac8          | JX471065                         | Chioc 35722          | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 7  | Encantado – Rio Janeiro Brasil ac8    | JX471057                         | Chioc 35723          | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 8  | Jundiaí – SP Brasil ac8               | JX471062                         | Chioc 35789          | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 9  | Vila Rami – SP Brasil ac8             | JX471067                         | Chioc 35834          | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 10 | Brasil ac8                            | HQ440217.1                       | NA                   | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 11 | Okinawa Japón ac5                     | AB684370                         | NA                   | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 12 | Okinawa Japón ac5                     | AB684369                         | NA                   | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 13 | Tokio Japón ac5                       | AB684373                         | NA                   | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 14 | Tokio Japón ac5                       | AB684371                         | NA                   | mitocondria <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |

|    |   |            |             |   |
|----|---|------------|-------------|---|
| 15 | Tokio Japón ac5                               | AB684372   | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 16 | Niterói – RJ<br>Brasil ac5                    | JX471059   | Chioc 35829 | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 17 | Hirajima-01. ac5                              | AB700680.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 18 | Hawaii-01 ac5                                 | AB700681.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 19 | Tailandia, Laos,<br>Camboya y<br>Myanmar ac5  | KU532144.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 20 | Bangkok<br>Tailandia ac4                      | AB684368.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 21 | Ishikawa Japón<br>ac3                         | AB684367   | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 22 | Kanagawa,<br>Japon ac1                        | AB684360.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 23 | Guangdong<br>China ac2                        | AB684365   | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 24 | Zhejiang China<br>ac6                         | AB684374.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 25 | Miyagi, Sendai<br>Japon<br>ac7                | AB684375.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 26 | Tailandia, Laos,<br>Camboya y<br>Myanmar ac13 | KU532146.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 27 | Tailandia ac13                                | KY703433.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 28 | Tailandia, Laoa,<br>Camboya y<br>Myanmar ac12 | KU532148.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 29 | Tailandia ac10                                | MK734440.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| 30 | Tailandia, Laos,<br>Camboya y<br>Myanmar ac10 | KU532147.1 | NA          | mitocondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i> |

|    |   |            |                  |  |
|----|---|------------|------------------|--|
| 31 | Tailandia ac16                                | KY703436.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 32 | Tailandia ac15                                | KY703435.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 33 | Tailandia ac4                                 | KY439006.1 | Voucher<br>Ac12F | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 34 | Tailandia, Laos,<br>Camboya y<br>Myanmar ac11 | KU532143.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 35 | Tailandia ac14                                | KY439007.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 36 | Japón,Ishikawa<br>ac3                         | AB684367.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 37 | Japón,<br>Kagoshima ac1                       | AB684362.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 38 | Taiwan,<br>Taichung ac1                       | AB684363.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 39 | China, Fujian,<br>Lianjiang ac2               | AB684364.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 40 | China,<br>Guangdong,<br>Shenzhen ac2          | AB684365.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 41 | Tailandia, Laos<br>Camboya y<br>Myanmar ac2   | KU532145.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 42 | Brasil<br>CHIOC:35831<br>ac9                  | JX471055.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 43 | Japón,<br>Kanagawa,<br>Yokohama ac7           | AB684377.1 | NA               | mitochondria<br><i>Angiostrongylus cantonensis</i>   |
| 44 | Brasil  | GU138116   | 6971             | mitochondria<br><i>Angiostrongylus costaricensis</i> |
| 45 | Alemania                                      | GQ982      | D28a             | mitochondria<br><i>Angiostrongylus vasorum</i>       |

NA: no asignado

## X. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

### Artículos donde se publican los resultados de la tesis

- **Solórzano, L.**, Bedoya, C., Hernández, H., Rodríguez, M., Rojas, L., Sánchez, F., Muñoz, M., Ramírez, C., Loja, R., Pizarro, J., Loureiro, A. (2021). Genetic Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* Isolates from Different Regions of Ecuador. *Investigatio*, 16, 52–61. doi:10.31095/investigatio.2021.16.5
- **Solórzano Álava, L.**, Hernández Alvarez, H., Bedoya Piloza, C., Rodríguez, M., & Rojas Rivero, L. (2022). *Achatina fulica* infectado por *Angiostrongylus cantonensis* en Napo, Ecuador. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 39(1), 122-3. doi:https://doi.org/10.17843/rpmesp.2022.391.10148
- **Solórzano, L.**, Chiluisa C., Sánchez S., Hernández, H., Rodríguez, M., Rojas, L., Sánchez F., Licuy R., Rojas, L., Conocimientos, percepciones y prácticas de médicos de atención primaria, sobre la infección por *Angiostrongylus cantonensis*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, en prensa 2022
- **Solórzano, L.**, Chiluisa C., Sánchez S., Licuy R., Hernández, H., Rodríguez, M., Sarracent J., Bedoya., Pico J., Sánchez F., Vega F., Rojas L. Intervención educativa sobre angiostrongiliasis humana para mejorar conocimientos, percepciones y prácticas de médicos de atención primaria de salud, Bionatura en prensa, Ecuador 2022

### Artículos del autor relacionados con el tema

- Solórzano, L, Sanchez-Amador F, Sánchez-Giler S, Pizarro-Velastegui J. *R. rattus* and *R. norvegicus*, as reservoirs of zoonotic endoparasites in Ecuador. *Journal MVZ Cordoba* 2021;26(3):e1260
- Solórzano-Alava L, Sánchez-Amador F, Valverde T. *Angiostrongylus (Parastrongylus) cantonensis* en hospederos intermediarios y definitivos en el Ecuador 2014-2017. *Biomédica*. 2019;39(2). ISSN 2590-7379
- Solórzano L, Narváez Y, Sánchez F, J Ortiz J. Alteraciones histopatológicas y microorganismos hallados en *Rattus norvegicus* infectadas con *Angiostrongylus cantonensis*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2018;29(2):472-478. ISSN 1682-3419
- Solórzano L, Sánchez F, Pérez C. Hallazgos histopatológicos en el Sistema nervioso central de *Rattus norvegicus* infectados con *Angiostrongylus cantonensis*. *Revista de Investigaciones veterinarias del Peru* 2016; 27(4):783-791
- Solórzano L, Martíni L, Hernández, H. Sarracent, J. E. Muzzio, J. Rojas, L. *Angiostrongylus cantonensis*: Un parásito emergente en Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2014, 66(1)
- Solórzano L, Sanchez F, Ortiz J, Presencia de larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) encontradas en el Sistema Nervioso Central en ratas (*Rattus*

*norvegicus*) Bioma 2016; 45:18-22 ISSN 2307-0560

## **Libros relacionados con el temas en los que colabora el autor**

### **Capítulos de Libros:**

***Angiostrongylus cantonensis*. Emergencia en América. La Habana: Academia; 2016. ISBN 978-959-270- 368-1**

•Martíni, L. Gomez, E. Muzzio, J. Solórzano, L . Descripción del primer foco de transmisión natural de *Angiostrongylus cantonensis*, en Ecuador. En: Martini Robles L, Dorta Contreras AJ, editores. *Angiostrongylus cantonensis*. Emergencia en América. La Habana: Academia; 2016. 250-255 del capítulo. ISBN 978-959-270- 368-1

•Solórzano L. Diagnóstico serológico de *Angiostrongylus cantonensis* en Ecuador. En: Martini Robles L, Dorta Contreras AJ, editores. *Angiostrongylus cantonensis*. Emergencia en América. La Habana: Academia; 2016. 250-255 del capítulo. ISBN 978-959-270-368-1

**Salud Pública Veterinaria. Grupo Luzuma; 2021, ISBN 978-9942-8700-5-6**

•Solórzano, L. Sánchez, F. *Angiotrongylus cantonensis*, situación en Ecuador. En Salud Publica Veterinaria. Grupo Luzuma; 2021. 61-66. ISBN 978-9942-8700-5-6

### **Eventos científicos donde se han expuestos los resultados del presente trabajo**

- Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabi. I Congreso de Investigacion en Salud Caracterizacion molecular de *Angiostrongylus cantonensis* en Ecuador. Ponente. 6 a 8 de Febrero de 2020
- VII Congreso de Higiene y Epidemiologia, Simposio enfermedades transmisibles, su prevención y control. Mesa redonda: *Angiostrongylus cantonensis*, investigaciones y perspectivas en Cuba y Ecuador, Ponente. 23 a 27 de Abril de 2018
- Hospital International conference. The rat lungworm another related parasitic diseases. *Angiostrongylus cantonensis* in Ecuador 2008 to present. Mahidol University, Faculty of medicine Siriraj, Bangkok, Tailandia. Jornada del 23 a 25 de Noviembre de 2017
- Universidad de Guayaquil Facultad de Ciencias Médicas I Congreso Internacional en Ciencias Fisiológicas. (Coautor –Póster) Solórzano L, Sanchez F. Cambios morfológicos post-simulación gástrica en larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* en un modelo experimental. 19-20 de Octubre de 2017
- Ciudad de Panamá-Panamá. XVIII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología y VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas. (Coautor – Póster). Solórzano L, Sanchez F, Ortiz J Presencia de larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* en el SNC de ratas. 16-20 mayo de 2017

- Quito-Ecuador XVII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología (Autoría-Poster). Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-antígenos de *Angiostrongylus cantonensis*. Mayo 2015
- Federación Latinoamericana de Parasitología. XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología. (Coautor-Conferencia Magistral). Luiggi Martini Robles, Jenny Muzzio Aroca, Luis Solorzano Alava, Linda Diaz C, Yasuji Amano. Caracterización de *Angiostrongylus cantonensis* utilizando microscopía de luz y electrónica . Desde el 6 al 9 de octubre de 2013
- Federación Latinoamericana de Parasitología. XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología. (Coautor-Poster). Luiggi Martini Robles, Jenny Muzzio Aroca, Luis Solorzano Alava. Morfología y ciclo evolutivo de *Angiostrongylus cantonensis* en *Achatina fulica*. Desde el 6 al 9 de octubre de 2013.
- Universidad Nacional de Chimborazo. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Tecnología Médica. IV Seminario Taller de terapia física y laboratorio clínico-histopatológico. UNACH (Expositor). Diagnóstico molecular de *Angiostrongylus cantonensis* en el Ecuador. Desde el 6 al 8 de Junio de 2012.