

ARTÍCULO ORIGINAL

Cultivo *in vitro* de larvas L₃ de nematodos obtenidas del caracol gigante africano *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) en Santa Fe de Antioquia

Nelly Solfania Heredia¹, Ann Sabrina Ávila¹, Luz Elena Velásquez^{1,2}

¹ Grupo de Microbiología Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. Más de 170 municipios colombianos están invadidos por *Lissachatina fulica*, caracol africano que puede portar larvas de nematodos de interés en salud humana y veterinaria. Los parásitos entran al caracol huésped intermediario en el estadio de larva L₁, y allí cambian a L₂ y L₃, formas estas capaces de infectar a vertebrados.

Objetivo. Estandarizar el cultivo *in vitro* de las L₃ portadas por especímenes de *L. fulica* recolectados en Santa Fe de Antioquia.

Materiales y métodos. Entre julio y noviembre de 2014 se recolectaron 10 caracoles, se sacrificaron y se digirieron con ácido clorhídrico al 0,7 %. Las larvas se recuperaron mediante la técnica de Baermann; se cultivaron 36 días en los medios Schneider, mínimo esencial de *Eagle modificado por Dulbecco* (*Dulbecco's Modified Eagles Minimal Essential Medium*, DMEM), y Roswell Park Memorial Institute (RPMI), con suero fetal bovino (SFB) al 20 % y sin este, y agua destilada con SFB al 20 %. Los medios de cultivo se cambiaron cada 36 horas. Las larvas se midieron con el microscopio utilizando reglilla ocular, y se evaluaron la supervivencia, la longitud y el ancho. Se calcularon datos estadísticos de resumen y se hicieron gráficos de cajas y bigotes, así como la prueba t de Student. El nivel de significación (p) se estableció como menor de 0,05.

Resultados. El 50 % de las larvas sobrevivió, 85 % en DMEM con SFB al 20 %, el 70 % con RPMI más SFB al 20 %, el 60 % en RPMI, el 50 % en Schneider más SFB al 20 %, el 45 % en Schneider y el 40 % en DMEM. El control sobrevivió diez días. Hubo diferencias significativas entre la longitud inicial promedio de las larvas y la longitud final promedio en los medios con suplementos: inicial, 645,83 µm; final en DMEM más SFB al 20 %, 732,65 µm (p<0,001); en RPMI más SFB al 20 %, 718,79 µm (p<0,001), y en Schneider más SFB al 20 %, 696,12 µm (p<0,01). No hubo diferencias significativas entre la anchura inicial promedio, de 24,99 µm, y la final.

Conclusiones. El mejor medio para cultivar las L₃ de *L. fulica* fue el DMEM más SFB al 20 %. En la evaluación del crecimiento larval, la longitud fue más informativa que la anchura. Las larvas estudiadas no correspondieron a *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* ni *Aelurostrongylus abstrusus*.

Palabras clave: nematodos; caracoles; medios de cultivo; técnicas *in vitro*; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3408>

***In vitro* culture of L₃ larvae of nematodes obtained from the African giant snail *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) in Santa Fe de Antioquia**

Introduction: Over 170 municipalities in Colombia have been invaded by *Lissachatina fulica*, an African snail that can carry larvae of nematodes of interest in human and veterinary health. Nematodes enter the host snail as larvae L₁ and then change to L₂ and L₃, the infectious form for vertebrates.

Objective: To standardize culture *in vitro* of L₃ carried by *L. fulica* from Santa Fe de Antioquia.

Materials and methods: Between July and November, 2014, 10 snails were collected, killed, and conserved with HCl 0.7%. Larvae were recovered using the Baermann technique and cultured for 36 days in Schneider, DMEM and RPMI media, with and without SFB 20% and distilled water with SFB 20%. Replacements were made every 36 hours; larvae were measured with an ocular micrometer on a microscope. Summary statistics were estimated; box and whisker plots were made; the t Student test was performed in SPSS 18™. A p-value below 0.05 was assumed as significant.

Results: Fifty per cent of the larvae survived. The highest survival and growth was 85% in supplemented DMEM. The final average length of larvae in supplemented media exceeded the initial one. There were

Contribución de las autoras:

Luz Elena Velásquez: consecución de moluscos y larvas de nematodos

Todas las autoras participaron en el diseño metodológico, el procesamiento de moluscos y las larvas de nematodos, la estandarización de la técnica de cultivo, el análisis de datos y la escritura del manuscrito.

significant differences between the average length of larvae cultured in supplemented media and the initial length. The initial width of larvae did not change.

Conclusions: The best medium for the culture of L₃ larvae was supplemented DMEM. The length provided more information than the width for the larval growth evaluation. The larvae studied did not correspond to *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* or *Aelurostrongylus abstrusus*.

Key words: Nematoda; snails; culture media; *in vitro* techniques; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3408>

Los nematodos parásitos de la súperfamilia Metastrongyloidea son de ciclo indirecto. Por lo general, sus huéspedes intermediarios son caracoles, en los cuales entran en el estadio larval 1 (L₁) cuando estos se comen las heces de vertebrados parasitados. En el molusco, las larvas cambian a L₂ y luego a L₃, estadio en el que tienen la capacidad de infectar a los vertebrados que las ingieren en alimentos contaminados o al consumir el tejido crudo o mal cocido de los caracoles que las portan (1-3).

En Colombia, los registros de pacientes infectados con nematodos patógenos transmitidos por moluscos son muy escasos (4). Sin embargo, en la actualidad, los habitantes de 29 departamentos del país se encuentran en riesgo de sufrir nematodosis relacionadas con la presencia del caracol invasor africano *Lissachatina (=Achatina) fulica* (Bowdich, 1822) (5,6). Este es un molusco terrestre originario del oriente de África, con registros en Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela. Además, está presente en Asia, Europa, Norteamérica y Oceanía (7-9).

En África, Brasil, Ecuador y en algunas islas del Pacífico, se ha demostrado que *L. fulica* representa un riesgo para la salud humana, ya que funge como huésped intermediario de nematodos de la súperfamilia Metastrongyloidea, como *Angiostrongylus cantonensis*, agente etiológico de la meningoencefalitis eosinofílica, enfermedad zoonótica endémica en países asiáticos. Además, en Brasil es vector de *Angiostrongylus vasorum*, parásito originario de Europa que afecta principalmente a los perros, y de *Aelurostrongylus abstrusus*, un nematodo patógeno para gatos y perros domésticos (10-14).

En Antioquia, el primer hallazgo de este caracol tuvo lugar en enero del 2012, en el municipio de Santa

Fe de Antioquia (15). En estudios parasitológicos de *L. fulica* provenientes de Santa Fe de Antioquia, se pudo demostrar la presencia abundante y frecuente de larvas L₃ (16), así como la riqueza de morfotipos al analizar los helmintos en caracoles africanos procedentes de otras regiones de Colombia. El tiempo de vida de las larvas en el laboratorio es muy corto, lo que exige jornadas de trabajo largas, intensas y agotadoras.

La posibilidad de disponer de formas larvarias de organismos de interés potencial en salud mediante su cultivo en laboratorio, ha permitido recopilar información sobre los cambios morfológicos de los helmintos, la relación entre huésped y parásito, las necesidades nutricionales de los parásitos y su organización estructural. Además, ha hecho posible la evaluación de antihelmínticos, la producción de vacunas y otras herramientas útiles en los programas para la prevención y el manejo de las nematodosis (17-20).

En este contexto, en el presente estudio se propuso estandarizar el cultivo *in vitro* de larvas L₃ en caracoles africanos de Santa Fe de Antioquia, con el fin de aumentar el tiempo de vida de los helmintos en el laboratorio y facilitar, así, las observaciones, mejorar la calidad de vida del personal encargado de los análisis y allanar el camino hacia futuras investigaciones.

Materiales y métodos

Recolección de los caracoles

Entre julio y noviembre de 2014, se recolectaron ejemplares de *A. fulica*, observando las medidas de protección necesarias (guantes y tapabocas), en el municipio de Santa Fe de Antioquia, localizado a 06° 33' 682" N y 75° 49' 746" O. Posteriormente, los ejemplares fueron trasladados por separado al Laboratorio de Malacología Médica y Tremátodos del PECET en la Universidad de Antioquia.

Sacrificio de los caracoles

En el laboratorio se midieron los caracoles y se los adormeció. Se quebró la concha de cada ejemplar y se retiró la parte blanda, la cual se cortó en trozos,

Correspondencia:

Luz Elena Velásquez, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, torre 2, laboratorio 730, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6514; fax (574) 219 6511
luzelena333@yahoo.com

Recibido: 13/09/16; aceptado: 24/10/17

se depositó en un vaso de precipitación, se cubrió con HCl al 0,7 % y se dejó en reposo durante seis horas (12,14).

Recuperación de las larvas

El contenido de cada vaso se depositó en un embudo siguiendo el método de Baermann. Se dejó en reposo durante 18 horas para permitir la migración de las larvas y, posteriormente, se recolectaron 15 ml del líquido en un tubo Falcon. La porción recolectada se dejó sedimentar durante 40 minutos, aproximadamente (18,19).

El contenido del tubo Falcon se observó con un estereomicroscopio Nikon SMZ445™ para recuperar las larvas con una pipeta Pasteur. Las larvas se extrajeron, se contaron y se depositaron en una caja de Petri con agua del grifo, y, posteriormente, se lavaron tres veces con suero fisiológico. Se midieron diez de las larvas, 140 se sembraron en los medios de cultivo seleccionados y diez se fijaron en alcohol al 96 % para su futuro estudio molecular.

Medios de cultivo

Las larvas se sembraron en tres medios de cultivo: Schneider, DMEM y RPMI, sin suplemento de SFB al 20 % y con este. Como medio de control se usó agua destilada más SFB al 20 %.

Para reducir la contaminación de los medios de cultivo, antes de sembrar las larvas, los platos de 12 pozos, las pipetas, las puntas, los tapabocas y los guantes se introdujeron en una cámara de bioseguridad y se irradiaron con luz ultravioleta durante 20 minutos.

Siembra de las larvas

La zona de trabajo se limpió con alcohol al 96 % y se mantuvieron los mecheros encendidos. Para cada medio de cultivo y para el control, se acondicionaron cuatro pozos del plato de ELISA, cada uno con un mililitro del medio de cultivo y cinco larvas. El volumen del medio de cultivo se midió con una micropipeta automática y las larvas se sembraron con una pipeta Pasteur. Los platos se incubaron en una estufa Memmert 854 Schwabach™ a 37 °C durante 36 días. El medio de cultivo de las larvas se cambió cada 36 horas. En cada ocasión se observó el protocolo de desinfección descrito.

Medición de las larvas

Para evaluar las diferencias en el crecimiento de las larvas, se midieron la longitud y la anchura

iniciales de 10 de los ejemplares y, a los 36 días, se midieron de nuevo en 10 larvas de cada medio de cultivo y del control.

Las larvas se midieron en un microscopio Nikon Eclipse E200™, con una reglilla ocular en los objetivos de 10X y 40X. También, se observaron las características morfológicas y se obtuvieron imágenes con una cámara Sony Cyber-shot Carl Zeiss™, modelo DSC-W35.

Análisis estadístico

Para las variables de anchura y longitud de las larvas cultivadas en los diferentes medios, se calcularon el promedio, la desviación estándar, el valor máximo y el valor mínimo. Se hizo una gráfica de caja de bigotes para comparar la anchura y la longitud de las larvas en cada medio de cultivo.

Se hizo una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se comparó el promedio de la longitud y de la anchura de las larvas cultivadas en cada medio con las mediciones iniciales mediante una prueba t de Student. Se asumió como significativo un valor de p menor de 0,05.

Los valores de las mediciones se registraron en Microsoft Excel 2010™ y los análisis estadísticos se hicieron con el programa SPSS™, versión 18 (Chicago, Illinois, USA), licencia amparada por la Universidad de Antioquia.

Consideraciones éticas

Este proyecto obtuvo el aval del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia.

Resultados

Se cultivaron 140 larvas durante 36 días, de las cuales sobrevivió el 50 % (70). En DMEM sobrevivieron ocho larvas (40%), en Schneider, nueve (45 %), en RPMI, 12 (60 %), en Schneider más SFB al 20 %, diez (50 %), en RPMI más SFB al 20 %, 14 (70%) y en DMEM más SFB al 20 %, 17 (85 %). Las larvas de control solo sobrevivieron diez días.

En cuanto a la morfología de las larvas, al inicio del ensayo se observaron la cutícula externa, el esófago filiforme seguido del bulbo esofágico y la apertura cloacal cerca de la cola, la cual es larga y termina en punta (figura 1). Las dimensiones de estas larvas se presentan en el cuadro 1; allí se evidencia que fueron diferentes a las registradas en las larvas L₃ de *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. abstrusus* (21,22).

Las larvas con 36 días en el medio de cultivo conservaron las características morfológicas de la larva inicial, aunque difirieron por la presencia de puntos pigmentados a lo largo del cuerpo (figura 2).

En la figura 3 y el cuadro 2, se observa que las larvas cultivadas en los medios con SFB alcanzaron una longitud promedio mayor que las cultivadas en los medios sin SFB. Asimismo, se aprecia que las larvas cultivadas en DMEM más SFB al 20 % presentaron la mayor longitud promedio, en tanto que la menor se obtuvo en las larvas cultivadas en RPMI. El promedio de la anchura de las larvas en los medios de cultivo evaluados fue similar al registro inicial.

El test de normalidad demostró que los datos tenían una distribución normal, ya que, en general, todos correspondieron al promedio o fueron cercanos.

En el cuadro 3 se evidencia que hubo diferencias estadísticas entre el promedio de la longitud de las larvas cultivadas en los medios con suplementos y el promedio de la longitud inicial, lo que indica que dichos medios favorecieron el crecimiento de las

larvas. No hubo diferencias estadísticas entre la anchura de las larvas cultivadas y la anchura inicial (no se presentan los datos).

Discusión

Las diferencias en algunos caracteres morfológicos y en las dimensiones de las larvas L₃ objeto de este estudio, sugieren que no correspondían a las L₃ de *A. cantonensis*, *A. costaricensis* ni *A. abstrusus* (21,22).

Todos los medios de cultivo evaluados permitieron que las larvas sobrevivieran por 36 días, destacándose el DMEM más SFB al 20 %, con una supervivencia de 85 %. Se obtuvieron resultados similares al cultivar larvas L₃ de *A. cantonensis* durante cuatro semanas en los medios RPMI 1640, NCTC 135, medio de Waymouth MB 752/1 (WYM) y medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con SFB al 20 %; en este caso, también se destacó el MEM más SFB al 20 %, con una supervivencia de 87 % (23). En ese mismo estudio, el medio de cultivo sin suplemento más favorable para la supervivencia de las larvas fue el RPMI (57 %), resultado similar al obtenido en el presente experimento (60 %).

En el presente estudio se demostró que el DMEM con SFB al 20 % es el medio de cultivo más adecuado para el cultivo *in vitro* de las L₃ obtenidas en ejemplares de *L. fulica* en Santa Fe de Antioquia, pues con él hubo un mayor incremento en la longitud de las larvas y un mayor porcentaje de supervivencia. Sin embargo, la anchura de los especímenes no aumentó. Este resultado es congruente con el reseñado para el cultivo de larvas L₃ de *A. cantonensis* en MEM con SFB al 20 %, en el cual las larvas incrementaron su longitud al cabo de 36 días, mas no su anchura, y pasaron al estadio de L₄ (19), evento este que no se observó durante el presente ensayo, posiblemente porque las larvas correspondían a una especie diferente de nematodo, cuyas necesidades son otras.

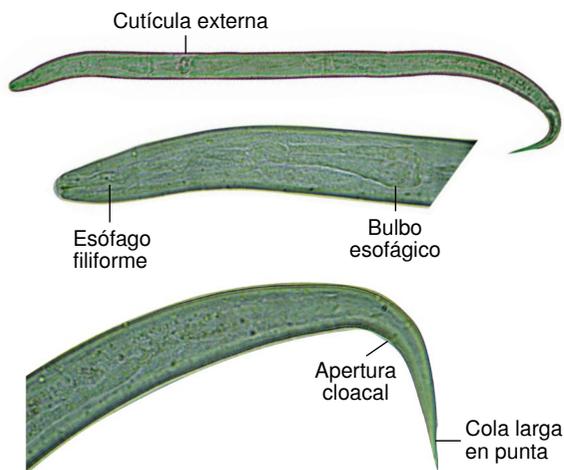


Figura 1. Morfología de la larva al inicio del experimento

Cuadro 1. Dimensiones estimadas en larvas L₃ de *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis*, *Aelurostrongylus abstrusus* y larvas L₃ sin identificar, obtenidas de ejemplares de *Lissachatina fulica* recolectados en Santa Fe de Antioquia. Todas las medidas están en micras (µm).

Características	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	Larvas L ₃ (iniciales) recolectadas en Santa Fe de Antioquia
Longitud (µm)	425-524	400-500	459-568	572-680
Anchura (µm)	23-34	20-30	26-34	20-29
Longitud del esófago (µm)	167-194	170	194-221	142-175
Poros excretor hasta la parte anterior (µm)	78-105	80-110	88-102	No se observó
Longitud del extremo posterior (µm)	34-44	30-40	34-44	48-57
Terminación de la cola (µm)	Punta fina	Indentación dorsal	Pomo redondo	Punta fina

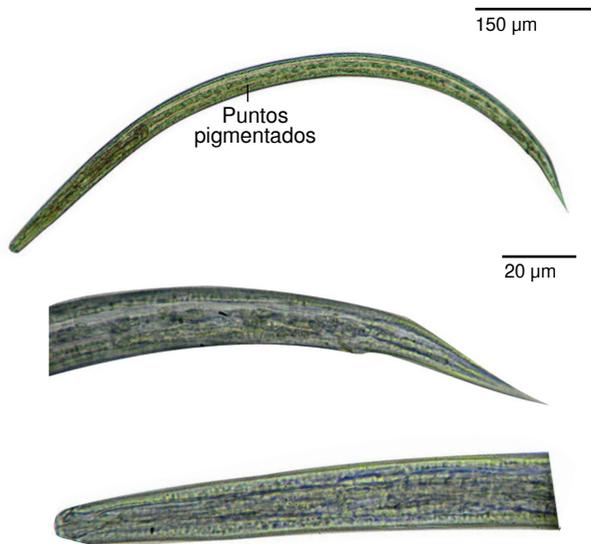


Figura 2. Morfología de la larva cultivada. Fotografía de Nelly Solfanía Heredia. Laboratorio de Malacología Médica y Tremátodos. Microscopio Nikon Eclipse E200®, 10X y 40X.

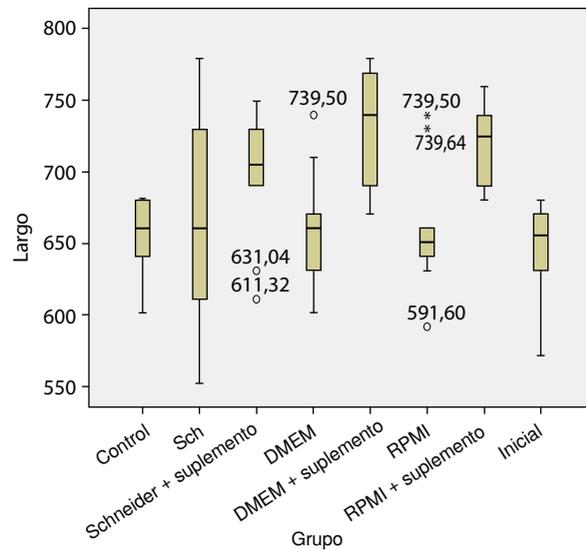


Figura 3. Comportamiento de los datos y promedios de la longitud (μm) de las larvas en los diferentes medios con respecto a la media inicial

Cuadro 2. Promedio, desviación estándar, valor mínimo y valor máximo de la longitud de las larvas de *Metastrongiloidea* cultivadas durante 36 días en tres medios con SFB y sin este

	Promedio (μm)	Desviación estándar (μm)	Valor mínimo (μm)	Valor máximo (μm)
Medidas iniciales	645,83	31,94	571,88	680,30
Medios de cultivo				
Control	654,70	27,18	601,46	680,34
Schneider	666,54	73,08	552,16	778,94
DMEM	661,61	40,64	601,46	739,50
RPMI	659,63	44,20	591,60	739,50
DMEM más SFB al 20 %	732,65	42,02	670,72	778,94
RPMI más SFB al 20 %	718,79	27,28	680,34	759,22
Schneider más SFB al 20 %	696,12	43,40	611,32	749,36

Cuadro 3. Diferencia del promedio de la longitud y la anchura iniciales en μm de las larvas en relación con el promedio final en los medios probados con SFB y sin este

Comparación	t de Student	p
Longitud		
Inicial Vs. control	0,669	0,512
Inicial Vs. Schneider	0,821	0,422
Inicial Vs. Schneider más suplemento	2,951	0,009
Inicial Vs. DMEM	0,965	0,348
Inicial Vs. DMEM más suplemento	5,202	0,000
Inicial Vs. RPMI	0,801	0,435
Inicial Vs. RPMI más suplemento	5,493	0,000
Ancho		
Inicial Vs. control	-1,599	0,127
Inicial Vs. Schneider	-0,375	0,712
Inicial Vs. Schneider más suplemento	0,187	0,854
Inicial Vs. DMEM	-2,305	0,037
Inicial Vs. DMEM más suplemento	-0,166	0,870
Inicial Vs. RPMI	-0,338	0,740
Inicial Vs. RPMI más suplemento	-0,309	0,761

En principio, los resultados obtenidos en el medio DMEM con SFB al 20 % posibilitaron el cultivo de los diversos morfotipos de L₃ obtenidos en *L. fulica*, con lo que fue posible comparar sus reacciones en el desarrollo morfológico, el crecimiento y la supervivencia e, incluso, experimentar con el incremento del tiempo de las larvas en el medio para propiciar su paso al estadio L₄. Además, se pudieron planear jornadas de trabajo menos exigentes y agobiantes para los investigadores encargados de los helmintos.

El cultivo *in vitro* de las larvas L₃ en DMEM con SFB al 20 % permitirá emplear nuevos enfoques en los estudios sobre los nematodos que se encuentran en *L. fulica* en Colombia, donde la diversidad de parásitos es un reto que apenas se comienza a vislumbrar y que exige establecer su identidad, y desarrollar herramientas diagnósticas y de eliminación de helmintos, entre otras.

Agradecimientos

A Jessika López, por su valiosa colaboración en el diseño experimental y el análisis estadístico. A Mercedes Villa Lloberas, de la Universidad de Barcelona, por sus sugerencias. A Iván Darío Vélez Bernal, director del PECET, por facilitar los equipos y el espacio físico para realizar la investigación.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado con recursos del CODI-Universidad de Antioquia en el marco del proyecto "Identificación taxonómica de *Achatina fulica* y obtención de nematodos del molusco invasor en seis departamentos de Colombia", código 222-CIEMB-096-13, y del proyecto de Regalías - Gobernación de Antioquia, código 46 0000 10 73.

Referencias

1. Wang Q, Wu D, Wei J, Owen R, Lun Z. Human *Angiostrongylus cantonensis*: An update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:389-95. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1328-5>
2. De Oliveira A, Torres E, Maldonado J, de Barros J, Fernandez M, Thiengo S. *Achatina fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse médico-veterinário em Goiás, Brasil. *Rev Pat Trop*. 2010;39:199-210.
3. Fontanilla I. *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich: Its molecular phylogeny, genetic variation in global populations, and its possible role in the spread of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (CHEN) (tesis). Nottingham: University of Nottingham; 2010.
4. Rodríguez G. Hematoquecia letal por angiostrongilosis abdominal. *Biomédica*. 2000;20:120-30. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v20i2.1055>
5. De La Ossa A, Carlos J, Lasso A. Registro del caracol africano gigante *Achatina fulica* (Bowdich 1822) (Mollusca: Gastropoda-Achatinidae) en Sincelejo, costa Caribe de Colombia. *Biota Colombiana*. 2012;13:247-52.
6. Linares E, Avendaño J, Martínez A, Rojas A. El caracol gigante africano, un visitante indeseado. *Miniguía de campo*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
7. Vogler RE, Beltramino AA, Sede MM, Gregoric DE, Núñez V, Rumi A. The giant African snail, *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae): Using bioclimatic models to identify South American areas susceptible to invasion. *Amer Malac Bull*. 2013;31:39-50. <https://doi.org/10.4003/006.031.0115>
8. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Sistema de Prevención, Monitoreo y Control del Caracol Gigante Africano (*Achatina fulica*). Fecha de consulta: 9 de enero de 2015. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar/pagina/sistema-de-prevencion-monitoreo-y-control-del-caracol-gigante-africano-achatina-fulica>
9. Fontanilla IK, Sta María IM, García J, Ghate H, Naggs F, Wade C. Restricted genetic variation in populations of *Achatina (Lissachatina) fulica* outside of East Africa and the Indian Ocean Islands points to the Indian Ocean Islands as the earliest known common source. *PLoS One*. 2014;9:e105151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105151>
10. Thiengo S, Maldonado A, Mota E, Torres E, Caldeira R, Carvalho O, et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Trop*. 2010;115:194-9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.005>
11. Contreras A, Núñez F, Pérez O, Lastre M, Magraner M, Bu-Coifíu R, et al. Peculiaridades de la meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis* en América. *Rev Neurol*. 2007;45:755-63.
12. Maldonado A, Simoes R, Oliveira A, Motta E, Fernandez M, Pereira Z, et al. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105: 938-41. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700019>
13. Coaglio Silva LA. Susceptibilidade e comportamento de *Achatina fulica* infectada com *Angiostrongylus vasorum* (tesis). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
14. Thiengo S, Fernandez M, Torres E, Coelho P, Lanfredi R. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina (Lissachatina) fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. *J Inverteb Pathol*. 2008;98: 34-9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.010>
15. Corantioquia. Un peligroso caracol gigante africano nos invade. Santa Fe de Antioquia. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2014. Disponible en: <http://nuevoportal.corantioquia.gov.co/Lists/Noticias%20Izquierda/Detalle.aspx?ID=3&ContentTypeId=0x010400852056182E12584AA4A86AF5CD531A56>
16. Corantioquia. Informe final del Convenio N° 792 de 2012, suscrito entre la Universidad de Antioquia y la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia. Medellín: Corantioquia; 2014. p. 78.
17. Smyth JD. *In vitro* cultivation of parasitic helminths. Boca Ratón: CRC Press; 1990. p. 1-144.
18. Yasuraoka K, Hata H. *In vitro* cultivation of parasitic helminths. *Prog Med Parasitol Jpn*. Tokyo: Meguro Parasitological Museum; 2003. p. 211-26.
19. Lin R, He J, Chung L, Lee J, Wang J, Yen C. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea): *In vitro* cultivation of infective third-stage larvae to fourth-stage larvae. *PLoS One*. 2013;8:e72084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072084>
20. Ahmed N. Cultivation of parasites. *Trop Parasitol*. 2014;4: 80-9. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.138534>
21. Ash LR. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J Parasitol*. 1970;56:249-53. <https://doi.org/10.2307/3277651>
22. Thiengo SC, Vicente JJ, Pinto RM. Redescription of *Angiostrongylus (Paranstrongylus) costaricensis* Morera & Céspedes (Nematoda: Metastrongyloidea) from Brazilian strain. *Rev Bras Zool*. 1997;14:839-44. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751997000400008>
23. Hata H. *In vitro* cultivation of the third and fourth stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *J Vet Med Sci*. 1993;55:345-7. <https://doi.org/10.1292/jvms.55.345>