

Diferencias morfológicas relevantes para la identificación específica de larvas de uncinarias y *Strongyloides stercoralis*

Relevant morphological differences for the specific identification of larvae of hookworms and *Strongyloides stercoralis*

Heber Silva-Díaz¹

RESUMEN

Objetivos: Describir las características morfológicas diferenciales más relevantes de los estadios larvarios de uncinarias (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*), y *S. stercoralis*, para su identificación específica en laboratorio clínico convencional. **Material y métodos:** Estudio observacional durante julio del 2015 a agosto del 2016. Se realizaron cultivos en placa de agar de muestras fecales positivas por microscopía a larvas de nematodos o huevos de uncinaria. Las larvas desarrolladas en cultivo fueron descritas morfológicamente mediante claves, se identificaron las características morfológicas diferenciales más relevantes y se ilustraron mediante microfotografías. **Resultados:** Las características morfológicas más relevantes para la diferenciación específica fueron la longitud de la cavidad bucal y la prominencia del poro genital en el estadio rabditiforme; y la forma del cuerpo, el extremo terminal de la cola y el diámetro del extremo anterior del intestino en relación al esófago en el estadio filariforme. **Conclusiones:** Las uncinarias *A. duodenale* y *N. americanus*, y *S. stercoralis* pueden identificarse específicamente por microscopía óptica mediante el análisis morfológico de sus estadios larvarios desarrollados en cultivo. Debido al requerimiento de equipos e insumos de uso común en laboratorio de microbiología, se recomienda esta metodología para uso en laboratorios clínicos convencionales.

PALABRAS CLAVE: *Strongyloides stercoralis*, Ancylostomatoidea, *Necator americanus*. (**Fuente:** DeCS BIREME).

SUMMARY

Objectives: To determine the most relevant morphologic differences of larval stages of hookworms (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*) and *S. stercoralis* for their specific identification in a conventional laboratory. **Methods:** An observational study was carried-out between July and August 2016. Positive fecal samples at microscopy to nematode larvae or to eggs of hookworms were cultured in agar plate. Larvae that developed in culture were described morphologically using passwords. We identified the most relevant differential morphologic features and illustrated them using microphotography. **Results:** The most relevant morphologic features that allow differentiating these nematodes were the longitude of the oral cavity and the prominence of the genital primordium for the rabditiform larva; the shape of the body, the terminal end of the tail and the diameter of the anterior extreme of the intestine in relation to the esophagus for the filariform larvae. **Conclusions:** Hookworms and *S. stercoralis* can be specifically identified by optic microscopic examination of their larval stages developed in culture. We recommend this methodology for conventional microbiology laboratories due to the requirement of simple equipment.

KEYWORDS: *Strongyloides stercoralis*, Ancylostomatoidea, *Necator americanus*. (**Source:** MeSH NLM).

¹ Laboratorio de Parasitología, Metaxénicas y Zoonosis, Hospital Regional Lambayeque. Lambayeque, Perú.

^a Doctor en ciencias, Biólogo-Microbiólogo.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

INTRODUCCIÓN

Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 1,5 millones de personas alrededor del mundo, principalmente de áreas tropicales y subtropicales, están infectados con parásitos geohelminetos. Asimismo, alrededor de 568 millones de niños en edad escolar viven en regiones de intensa transmisión de estas parasitosis, en los que incluyen la estrongiloidiasis y uncinariasis (1). La estrongiloidiasis (causada por *Strongyloides stercoralis* y *S. fullebornii*), y uncinariasis (causadas por *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y eventualmente por *A. ceylanicum*), son infecciones parasitarias helmínticas endémicas en varias regiones del Perú e hiperendémicas en otras, con frecuencias superiores a 6% y 30% respectivamente (2,3).

Sin embargo, se desconoce varios aspectos de la epidemiología y clínica de estas enfermedades en el Perú, entre otras razones, debido a que los estudios de investigación y de diagnóstico de laboratorios clínicos en el país, no consideran técnicas específicas para la detección y diferenciación de las especies parasitarias en mención.

Conocer la diferencia entre las larvas es importante para la salud pública porque permite identificar la especie de nematodo y por lo tanto la enfermedad, en un contexto nacional donde la frecuencia y distribución de estas dos parasitosis aún se desconocen. Asimismo, diferenciar correctamente las larvas de uncinarias y *S. stercoralis* en el laboratorio clínico es relevante en el manejo clínico del paciente, por cuanto las enfermedades requieren tratamiento antiparasitario diferenciado, y sus complicaciones y riesgos no son las mismas. Por otra parte, en estrongiloidiasis, la presencia de larvas filariformes en heces, además de las rabditiformes, demuestra la multiplicación acelerada del parásito en su ciclo autoinfectivo, indicando un síndrome de hiperinfección.

Por esta razón, este estudio tuvo como objetivo describir las características morfológicas diferenciales más importantes de los estadios larvarios rabditiforme y filariforme de las uncinarias (*A. duodenale* y *N. americanus*), y *S. stercoralis*, para su identificación específica en laboratorio clínico convencional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo, observacional. Desde julio de 2015 a agosto de 2016 las muestras fecales positivas

a larvas de nematodos (*Strongyloides*) o huevos de uncinaria, detectados por examen microscópico directo en el Laboratorio de Parasitología, Metaxénicas y Zoonosis del Hospital Regional Lambayeque, fueron analizadas por la técnica de cultivo en placa de agar (4).

Cultivo y desarrollo de los estadios larvarios

El cultivo en placa de agar permitió desarrollar todos los estadios larvarios para su posterior descripción e ilustración de las características morfológicas diferenciales más importantes mediante microscopía óptica. En general se siguieron los procedimientos descritos previamente por Botero y Restrepo, 2012 (4), a los que se le hicieron algunas modificaciones.

Las muestras de materia fecal incluidas en el estudio fueron conservadas a temperatura ambiente (20 a 25 °C), hasta ser cultivadas en un lapso de tiempo no mayor a ocho horas desde su recolección. La conservación en refrigeración de 2 a 8 °C no se recomendó por considerarse adversa para mantener la viabilidad y motilidad de las larvas de *S. stercoralis* y la viabilidad de los huevos de uncinaria. La técnica de cultivo en placa de agar consistió en colocar 2 g de materia fecal en el centro de la placa usando la técnica aséptica microbiológica, se selló la placa con parafilm y se incubó a placa derecha a 30° C y en condiciones de aerobiosis. La positividad del cultivo y el desarrollo de las larvas se evidenció indirectamente por el crecimiento de colonias bacterianas dispuestas en “caminos serpenteantes” sobre la superficie del agar. Las larvas se recuperaron de la superficie del agar agregando 10 ml de formalina al 10%, luego la suspensión larvaria se dejó sedimentar espontáneamente y conservó en un tubo de centrífuga.

Las modificaciones a la técnica referenciada consistieron en los siguientes puntos:

1. El medio de cultivo usado fue el Mc Conkey en lugar del Agar Nutritivo. El primer medio ofreció colonias bacterianas visualmente más notorias (colonias lactosa positivas de color grosella con precipitado de sales biliares), además, fue un sustrato favorable para el desarrollo de las larvas (similar al ofrecido por el Agar Nutritivo), comprobándose que los componentes químicos selectivos del medio no afectaron su desarrollo.
2. Las muestras fecales de consistencia semisólida y sólida fueron ablandadas agregando solución salina estéril y homogenizadas hasta convertirla en una suspensión acuosa densa. Se inoculó 2 ml

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

de la suspensión usando pipetas plásticas estériles evitando salpicaduras y aerosoles. Esta modificación permitió garantizar la movilidad de las larvas en la muestra inoculada, a partir del cual se desplazan hacia la superficie del agar diseminando bacterias en su trayecto, convirtiendo su cuerpo en una viva asa de siembra.

3. La incubación para desarrollar larvas de Uncinaria se realizó hasta por seis días, en lugar de dos (la incubación para *S. stercoralis* sí fue de dos días). Los huevos de uncinaria requirieron mayor tiempo de incubación para eclosionar (48 a 72 horas) y por lo tanto el desarrollo a larvas filariformes también se prolongó.

Descripción de las características morfológicas diferenciales relevantes

Las larvas recuperadas en distintos momentos de la incubación se estudiaron mediante microscopía óptica. Las características morfológicas diferenciales de los estadios rhabditiforme y filariforme de las tres especies fueron verificadas usando claves taxonómicas descritas previamente (5–7). Además, se priorizaron en número de orden aquellas características más relevantes, teniendo como criterio su conservación específica, facilidad de visualización y aplicabilidad en laboratorios de análisis clínicos convencionales. Asimismo, se registraron las características

morfológicas mediante microfotografías usando un microscopio con software para establecer dimensiones (Leica®).

El protocolo de estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética en investigación del Hospital Regional Lambayeque.

RESULTADOS

Se obtuvieron cultivos positivos y desarrollo exitoso de larvas filariformes de *S. stercoralis* entre dos a tres días de incubación. Mientras que se requirió de tres a cuatro días para obtener larvas rhabditiformes de Uncinaria y cinco a seis días para las filariformes. El tiempo menor requerido para el desarrollo de las larvas de *S. stercoralis* fue debido a que en el momento de la siembra, la materia fecal ya contiene larvas rhabditiformes (eclosionadas en el intestino), e incluso larvas filariformes en casos de síndromes de hiperinfección (Figura 1A).

Las características morfológicas más relevantes para diferenciar las larvas de este primer estadio (rhabditiformes), se muestran en la tabla 1 y se ilustran en las figuras 1B y 2A. Cabe destacar que en este estadio las uncinarias *A. duodenale* y *N. americanus* no son diferenciables morfológicamente mediante microscopía óptica.

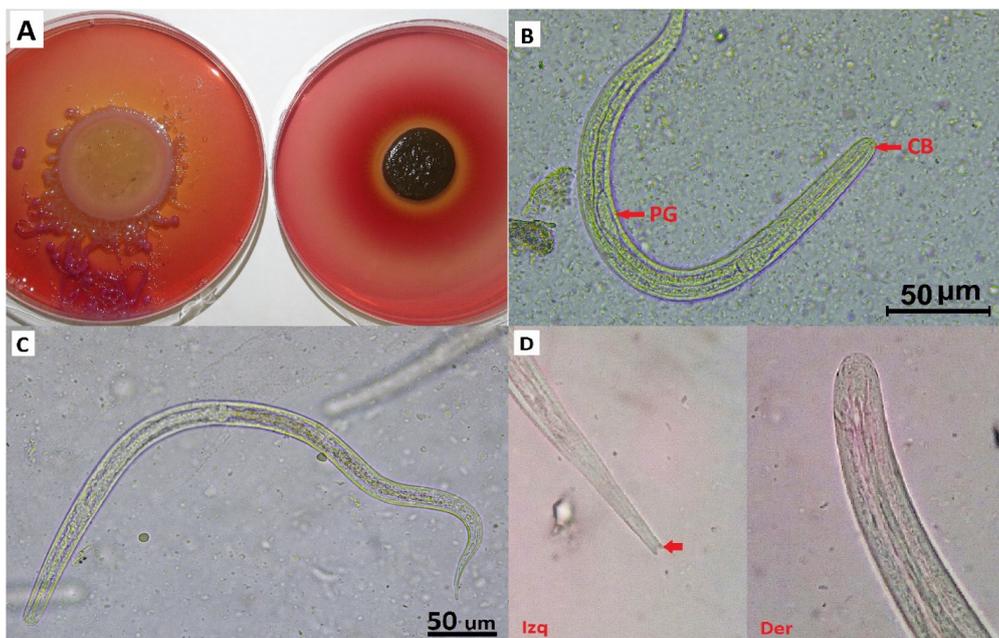


Figura 1. A: Cultivo de agar en placa para uncinarias y *S. stercoralis*, positivo (izquierda) y negativo (derecha). Larvas de *S. stercoralis*: B: estadio rhabditiforme, C: estadio filariforme y D: extremo posterior (izquierda) y anterior (derecha).

CB: Cavidad bucal, PG: Poro genital.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

Tabla 1. Características morfológicas diferenciales (descritas en orden de relevancia), de las larvas en estadio rabaditiforme de *S. stercoralis* y Uncinaria.

| Características | <i>S. stercoralis</i> | Uncinaria |
|--|-----------------------------|---|
| Cavidad bucal | Corta | Larga, con apariencia de surco en una distancia igual o mayor al ancho del cuerpo anterior. |
| Poro genital | Prominente, corto y ahusado | Discreto |
| Extremo terminal de la cola | Afilada | Marcadamente afilada y estrecha |
| Diámetro de la cabeza en relación al cuerpo anterior | Similar | Menor |
| Rango de longitud (µm) | 300-380 µm | 250-300 µm |

Tabla 2. Características morfológicas diferenciales (descritas en orden de relevancia), de las larvas en estadio filariforme de *S. stercoralis* y Uncinaria.

| Características | <i>S. stercoralis</i> | Uncinaria |
|---|-----------------------|---|
| Forma del cuerpo | Delgado | Corto y de apariencia robusta |
| Extremo terminal de la cola | Bifurcada | Estrechamente alargada o afilada |
| Diámetro del esófago en relación al intestino | Similar | Grande |
| Rango de longitud (µm) | 490 – 630 | 660 – 720 |
| | | <i>A. duodenale</i> <i>N. americanus</i> |
| Diámetro del extremo anterior del intestino en relación al esófago | | Menor Similar |
| Extremo terminal de la cola | | Estrechamente alargada Afilada |
| Estriamiento de la envoltura | | Poco perceptible Marcado |
| Ubicación del poro genital en relación a la porción media del intestino | | Por detrás Por delante |
| Forma de la cabeza | | Plana Redondeada |
| Rango de longitud (µm) | | 660 – 720 590 – 660 |

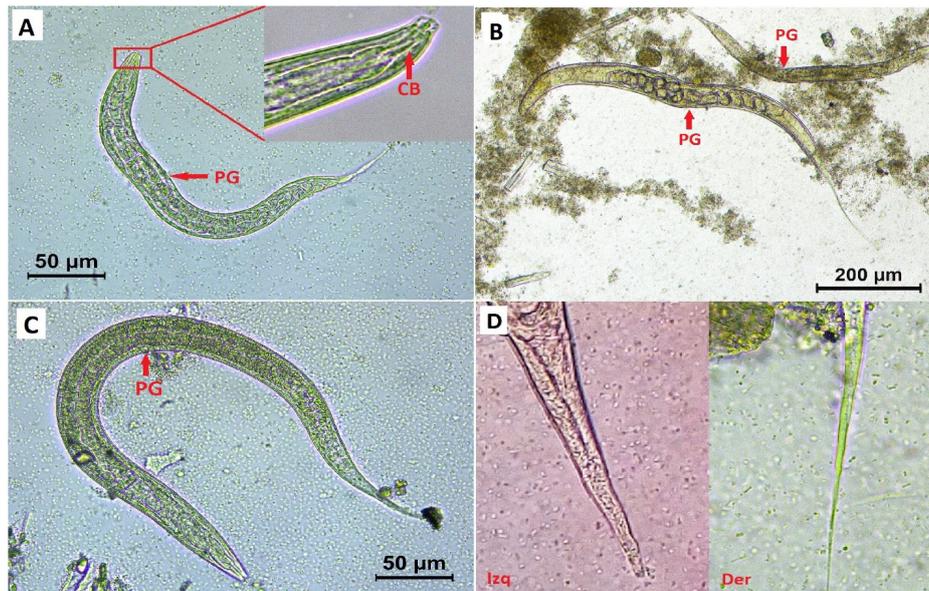


Figura 2. Larvas de Uncinaria: A) estadio rabaditiforme, B) estadio filariforme de *A. duodenale*, C) estadio filariforme de *N. americanus* y D) extremo terminal del estadio filariforme de *N. americanus* (izquierda) y *A. duodenale* (derecha).

CB: Cavidad bucal, PG: Poro genital.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

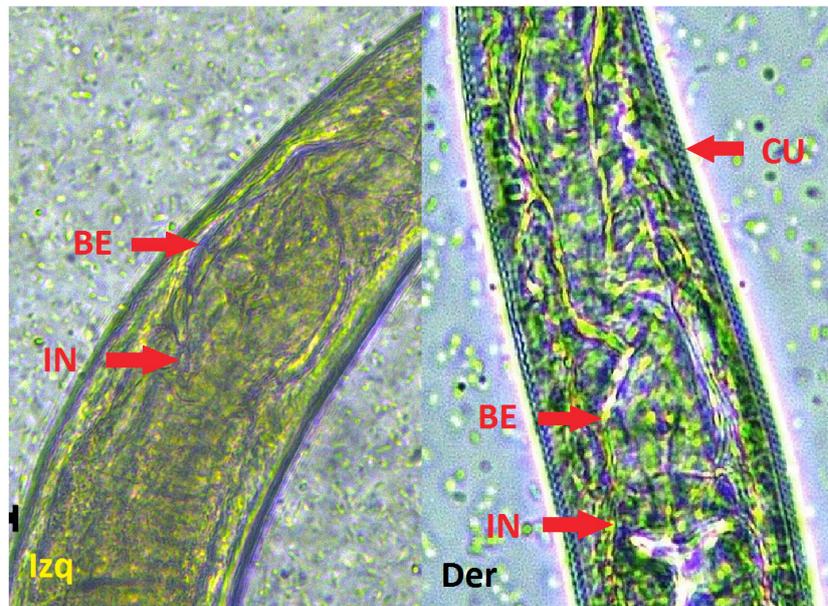


Figura 3. Extremo proximal de larvas filariformes de *A. duodenale* (izquierda) y *N. americanus* (derecha), mostrando diferencias en el estriamiento de la cutícula y el diámetro del extremo anterior del intestino en relación al esfago. BE: bulbo esofágico, IN: Intestino, CU: cutícula.

Las características morfológicas más relevantes para diferenciar las larvas filariformes de los nematodos en estudio se muestran descritas en la tabla 2 e ilustradas en las figuras 1C, 1D, 2B, 2C y 2D. En la figura 3, se muestran diferencias entre larvas filariformes de *A. duodenale* y *N. americanus*.

DISCUSIÓN

Si bien existen técnicas moleculares y serológicas para detectar y diferenciar la especie helmíntica en cuestión, éstas son caras y requieren laboratorios complejos y equipamiento costoso y sofisticado, que no están al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos públicos (8–10). Mientras que, el cultivo in vitro de las larvas y su posterior diferenciación morfológica mediante microscopía óptica es barato y puede implementarse en laboratorios con equipamiento básico de cultivos microbiológicos. No obstante, esta técnica requiere de un analista calificado y entre 2 a 6 días de tiempo para culminar el examen.

La técnica de cultivo en placa provee dos utilidades:

1. Permite la detección de *S. stercoralis* y Uncinaria al segundo y cuarto día respectivamente (evidenciado por el crecimiento bacteriano), con una alta sensibilidad (89% o más), en comparación a otras técnicas convencionales de microscopía o cultivo (11,12). Es en este momento del cultivo que se

podría realizar el estudio morfológico de las larvas rhabditiformes y diferenciar *S. stercoralis* y Uncinaria.

2. Da lugar al desarrollo completo de las larvas, desde la incubación del huevo (caso de Uncinaria), hasta el estadio filariforme. Sólo en este último estadio se pueden diferenciar morfológicamente las especies de uncinarias, razón por el que es tan importante que la técnica de cultivo promueva la evolución completa.

Las larvas rhabditiformes (larvas recién eclosionadas, también denominadas L1, de *S. stercoralis* y Uncinaria presentan una longitud de 250 a 380 μm y se caracterizan por presentar un cuerpo corto, similar al nematodo del género *Rhabditis*. Mientras que, el estadio filariforme, también denominado infectante, es de mayor tamaño (490 – 720 μm), evolucionan mediante sucesivas mudas en condiciones de humedad y temperaturas adecuadas, y se caracterizan presentar a un cuerpo alargado, similar al nematodo del género *Filaria*.

El tamaño relativo de las larvas es una aproximación específica importante, sin embargo no lo considero un criterio relevante a recomendar debido a que no todos los laboratorios cuentan con láminas patrón o microscopios con sistemas informáticos para realizar las mediciones.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

No fue posible realizar estudios inmunológicos o moleculares a las larvas para complementar los resultados, lo cual consideramos una limitación del estudio.

Se concluye que la longitud de la cavidad bucal y la prominencia del poro genital son las características morfológicas más relevantes para diferenciar las larvas rabditiformes de uncinarias y *S. stercoralis*; asimismo, en el estadio filariforme lo son la forma del cuerpo, el extremo terminal de la cola y el diámetro del extremo anterior del intestino en relación al esófago.

Fuentes de financiamiento y de conflictos de interés:

Una parte del estudio fue autofinanciado y otra por la Dirección de Investigación del Hospital Regional Lambayeque que financió los gastos de uso de infraestructura y equipamiento. El autor declara no tener conflictos de interés.

Correspondencia:

Heber Silva-Díaz
Dirección de Investigación del Hospital Regional Lambayeque.
Av. Vía de Evitamiento Norte con Av. El Progreso.
Chiclayo, Perú.
Teléfono N° 051 965902275
Correo electrónico: hsilva@hrlamb.gob.pe

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Soil-transmitted helminth infections. Washington: World Health Organization; 2017. (Citado el 16 de diciembre del 2017) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/>
2. Marcos R, Cabrera R, Machicado JD, et al. Distribution of prevalence of *Strongyloides stercoralis* in Peru (1981-2010): an exploratory study. *Rev Peru Parasitol.* 2010; 18(2):39-49.
3. Ibáñez N, Jara C, Guerra M, Díaz L. Prevalencia del enteroparasitismo en escolares de comunidades nativas del Alto Marañón, Amazonas, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2004; 21(3):126-33.
4. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas incluye animales venenosos y ponzoñosos. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2012.
5. Viney M, Lok J. The biology of *Strongyloides* spp. *WormBook.* 2015.p.1-17. (Citado el 16 de diciembre del 2017) Disponible en: http://www.wormbook.org/chapters/www_genomesStrongyloides.2/strongyloides.2.html
6. Yoshida Y. Morphological differences between *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* in the fourth larval stage. *J Parasitol.* 1966; 52(1):122.
7. Beltrán M, Tello R, Náquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Lima: Instituto Nacional del Perú; 2003.
8. Chidambaram M, Parija SC, Toi PC, et al. Evaluation of the utility of conventional polymerase chain reaction for detection and species differentiation in human hookworm infections. *Trop Parasitol.* 2017; 7(2):111-6.
9. Gyawali P, Sidhu JPS, Ahmed W, Jagals P, Toze S. Comparison of culture-based, vital stain and PMA-qPCR methods for the quantitative detection of viable hookworm ova. *Water Sci Technol.* 2017; 75(11):2615-21.
10. Khurana S, Sethi S. Laboratory diagnosis of soil transmitted helminthiasis. *Trop Parasitol.* 2017; 7(2):86-91.
11. Barreto RE, Narváez J, Sepúlveda NA, et al. Combination of five diagnostic tests to estimate the prevalence of hookworm infection among school-aged children from a rural area of Colombia. *Acta Trop.* 2017; 173:160-70.
12. Campo L, Gutiérrez LA, Cardona J. Infección por *Strongyloides stercoralis*: metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). *Rev Esp Salud Publica.* 2014; 88(5):581-600.

Recibido: 10/02/2018

Aceptado: 27/09/2018