

Descripción de alteraciones histopatológicas en riñones de *Rattus norvegicus* seropositivos a *Leptospira* spp.

Histopathological description in *Rattus norvegicus*'s kidneys seropositives to *Leptospira* spp.

Santiago Duque-Arias^{1*}, Ingrid L. Jaramillo Delgado², Diego A. Aranzazu Taborda³

RESUMEN

El objetivo del estudio fue describir los hallazgos histopatológicos más comunes observados mediante la tinción Hematoxilina-Eosina en riñones de *Rattus norvegicus* infectados naturalmente y seropositivos a *Leptospira* spp mediante la técnica Microglutinación en placa (MAT). Se capturaron 165 roedores de tres localidades de Antioquia (Turbo y Medellín), Se tomaron muestras de riñón de los roedores seropositivos por MAT y se utilizó tinción Hematoxilina-Eosina para evaluar las lesiones microscópicas y Warthin-Starry para visualizar la bacteria. Los diagnósticos morfológicos con mayor frecuencia fueron la nefritis intersticial crónica (45.0%), seguido de congestión vascular (20.1%) y pielonefritis intersticial crónica (10.6%). Los procesos patológicos se clasificaron en 73.1% como moderados y 26.9% como leves. No se observó el agente con la tinción Warthin starry.

Palabras clave: leptospirosis, patología, salud pública, rata

¹ Grupo GINVER, Facultad de Medicina Veterinaria, Corporación Universitaria Remington, Colombia

² Grupo de Investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Medellín, Colombia

³ Grupo de Investigación en Patobiología Quirón, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

* Autor para correspondencia: Santiago Duque-Arias; santiago.duque@uniremington.edu.co

Recibido: 11 de mayo de 2023

Aceptado para publicación: 30 de junio de 2024

Publicado: 30 de agosto de 2024

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the most common histopathological findings observed by Hematoxylin-Eosin staining in kidneys of *Rattus norvegicus* naturally infected and seropositive to *Leptospira* spp using the Microscopic Agglutination Test (MAT) technique. In total, 165 rodents were captured from three locations in Antioquia (Turbo and Medellín). Kidney samples were taken from the seropositive rodents by MAT and Hematoxylin-Eosin staining was used to evaluate the microscopic lesions and Warthin-Starry to visualize the bacteria. The most frequent morphological diagnoses were chronic interstitial nephritis (45.0%), followed by vascular congestion (20.1%) and chronic interstitial pyelonephritis (10.6%). The pathological processes were classified 73.1% as moderate and 26.9% as mild. The agent was not observed with the Warthin starry stain.

Key words: leptospirosis, pathology, public health, rat

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad causada por una espiroqueta Gram negativa, con más de 300 serotipos basados en antígenos aglutinantes, que pueden afectar a más de 150 especies de mamíferos (Boey *et al.*, 2019), e incluso ha sido reportada en anfibios y reptiles (Loffler *et al.*, 2014). Los roedores son conocidos como el mayor reservorio de la enfermedad (Loffler *et al.*, 2014; Roqueplo *et al.*, 2014), así como los mayores transmisores, por su amplia relación con el hombre en el medio urbano y por su método de infección a través de laceraciones en la piel, inhalación de aerosoles o ingestión de alimentos contaminados con orina de animales positivos (Athanzio *et al.*, 2008; Calderón *et al.*, 2014).

La leptospirosis es una enfermedad que se encuentra distribuida en todo el mundo; sin embargo, de mayor importancia en las regiones tropicales por la influencia del clima, topografía, las prácticas de crianza de los animales domésticos y la poca asistencia sanitaria, lo cual favorece una mayor seroprevalencia del patógeno (Martins y Lilenbaum, 2013; Calderón *et al.*, 2014).

Leptospira spp afecta generalmente al riñón, hígado, pulmón y corazón; sin embargo, puede presentar lesiones en otros órganos adyacentes y los signos clínicos pueden depender del serotipo que genere la infección y de la especie animal afectada (Adler y Moctezuma, 2010; Da Silva *et al.*, 2012). En Colombia, *Leptospira* spp se encuentra ampliamente distribuida, alcanzando prevalencias entre 6 a 35% en humanos y entre 25 a 83% en roedores, siendo esta última especie la que presenta una mayor tasa entre todos los mamíferos (Carreño *et al.*, 2017).

Existen diferentes técnicas diagnósticas para *Leptospira* spp. La prueba de referencia y de rutina es la micro aglutinación en placa (MAT) (OMSA, 2023). Además, se dispone de pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y la PCR cuantitativa, así como del diagnóstico histopatológico por tinción de Warthin Starry y los cultivos bacteriológicos (Fornazari *et al.*, 2012). Las ratas, principalmente la rata noruega o rata marrón (*Rattus norvegicus*) y la rata negra (*R. rattus*), son consideradas como el mayor reservorio de la enfermedad y son relativamente resistentes a estas; no obstante, se dispone de diversos estudios en ratas infectadas natural o experi-

mentalmente con la bacteria con resultados variables, debido a la variabilidad que se observa en las lesiones, especialmente en las alteraciones histopatológicas renales (Tucunduva *et al.*, 2007; Boey *et al.*, 2019). En el presente estudio se describe los hallazgos histopatológicos más comunes observados mediante la tinción Hematoxilina-Eosina en riñones de *Rattus norvegicus* infectados naturalmente y seropositivos a *Leptospira* spp mediante la técnica MAT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación es resultado de múltiples proyectos epidemiológicos financiados por las secretarías de salud de los municipios de Turbo, Antioquia, Colombia y Medellín, Antioquia, Colombia, y la participación voluntaria de un centro de conservación de fauna silvestre de Medellín, Antioquia, Colombia. Los proyectos se ejecutaron desde 2013 y 2014 con la recolecta de especímenes y realización de pruebas serológicas, y en 2015 con el análisis histopatológico de las muestras.

Consideraciones Éticas

Los animales fueron capturados por la Secretaría de Salud de Medellín y Turbo de Antioquia, Colombia, como estrategia de control de roedores y determinación de agentes infecciosos. Todos los procedimientos ejecutados cumplieron con las consideraciones éticas establecidas por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales (CEEA) de la Universidad de Antioquia.

Captura de Roedores

Los roedores capturados fueron identificados como *Rattus norvegicus*, de acuerdo a las características morfológicas (cuerpo grande y robusto, orejas pequeñas y peludas, la longitud de la cola es más pequeña que el cuerpo, pelaje pardo a rojizo en dorsal y blanuzco en ventral) que los diferencia de otros

roedores domésticos presentes en el país (Cruz-Céspedes, 2017). Se capturaron 165 roedores en varias ciudades de Antioquia, Colombia. En Turbo, en el nororiente antioqueño, se capturaron 57 individuos, en el centro de Medellín, en un parque de conservación de fauna silvestre se capturaron 50, y en la comuna cuatro de Medellín a 58 roedores. Las ratas fueron capturadas con trampas de captura viva tipo Tomahawk, posteriormente anestesiadas con ketamina 5%, xilacina 2% y tramadol 5%, y sacrificados con punción intracardiaca con Eutanex® (Compuesto de Pentobarbital sódico 390 mg/ml, Difenilhidantoína sódica 50 mg/ml) en dosis de 0.1 ml/50 g de peso vivo.

Se extrajeron los riñones izquierdos y se conservaron en formaldehído al 10%. Los cadáveres de las ratas fueron descartados de acuerdo con el protocolo de disposición de material biológico según el lugar donde se realizó. Asimismo, se descartaron los riñones que no fueron debidamente conservados y aquellos de roedores que no fueron seropositivos a *Leptospira* spp por la prueba de microaglutinación en placa – MAT.

Microaglutinación en Placa

Se tomaron muestras de sangre (1-3 ml) por punción cardiaca en tubos sin anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 3810 x g durante 20 min para extracción de suero. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento para la determinación de anticuerpos contra *Leptospira* spp mediante la prueba de MAT, realizada en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical de Medellín, Colombia. Brevemente, esta técnica consiste en mezclar volúmenes iguales de sueros diluidos en serie con leptospiros vivas. La prueba se lee 2 h después de la incubación a 30 °C con un microscopio de campo oscuro. Los resultados se expresan como títulos de dilución de suero (Goris y Hartskeerl, 2014). Se consideraron las muestras positivas mayores a 1:200 (OMSA, 2008).

.Histopatología Renal

Todas las muestras seropositivas por MAT (154/165) fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia. Se procesó un riñón de cada roedor por lámina. Para esto, las muestras fueron embebidas en parafina y cortadas en secciones del tejido de 2 μ m, y ser teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE) para la descripción de alteraciones microscópicas, y la tinción de Warthin-Starry para la identificación de las bacterias. Esta última coloración es a base de nitrato de plata y se utiliza comúnmente para la visualización de espiroquetas, como *Leptospira* spp. Para más detalle de la coloración remitirse a Farouk *et al.* (2018).

Ambos procesos se analizaron en aumentos 40X, 100X y 400X con un microscopio óptico Olympus CX23 (Olympus, Tokio, Japón). Se tomaron microfotografías de las lesiones más representativas con un microscopio con cámara adaptada Leica EC3 (Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

RESULTADOS

Se trabajó con 154 roedores *Rattus norvegicus* positivos a *Leptospira* spp. En la evaluación histopatológica se observaron depósitos de calcio y proteicos, presencia de pigmentos, infiltrados leucocitarios (eosinófilos, linfocitos, neutrófilos, macrófagos y/o plasmocitos), congestión vascular, edema intersticial, necrosis tubular, regeneración tubular, degeneración vacuolar, engrosamiento glomerular, proliferación glomerular y fibrosis. Algunas de estas lesiones se pueden observar en la Figura 1.

Las lesiones identificadas permitieron formular los diagnósticos morfológicos (Cuadro 1). Es importante resaltar que en algunos casos se dieron hasta dos diagnósticos morfológicos debido a que presentan similar relevancia dentro del paciente. El diagnósti-

co con mayor frecuencia fue la nefritis intersticial (45.0%), seguido de congestión vascular (20.1%) y pielonefritis intersticial crónica (10.6%). Los diagnósticos morfológicos en su mayoría fueron de grado moderado (73.1%) y con una menor cantidad de casos de forma leve (26.9%). No se clasificó ninguna muestra con un proceso patológico severo. Ninguna muestra fue positiva por Warthin-Starry.

DISCUSIÓN

La nefritis intersticial crónica fue el diagnóstico morfológico más frecuente en este estudio (45.0%), el cual se caracterizó por presentar un infiltrado linfoplasmocitario y fibrosis en el estroma del riñón (Figura 1A y 1B). Este hallazgo ha sido reportado en roedores infectados con *Leptospira* spp en otros estudios (Tucunduva *et al.*, 2007; Agudelo-Flórez *et al.*, 2013; Torres-Castro *et al.*, 2016).

En este estudio se encontraron lesiones histopatológicas que se relacionan tanto con procesos agudos como crónicos. Entre las lesiones de carácter agudo se halló degeneración vacuolar, necrosis tubular, depósitos hialinos en los túbulos renales, edema intersticial y congestión vascular. Da Silva *et al.* (2012) reportan que pocos días post infección, la principal lesión que se evidencia es la necrosis tubular, y es esta la que genera una inmunodeficiencia para el control de la infección. Sin embargo, en el presente estudio únicamente se encontró esta lesión en grado leve. Asimismo, Villanueva *et al.* (2014) encontraron principalmente congestión, ocasionalmente acompañada de necrosis tubular, sin presencia de infiltrado leucocitario, mientras todas las muestras que en la presente investigación presentaron congestión en algún grado (desde leve hasta severo); posiblemente debido a que la mayoría de los roedores evaluados en este estudio se encontraban en un estado subagudo.

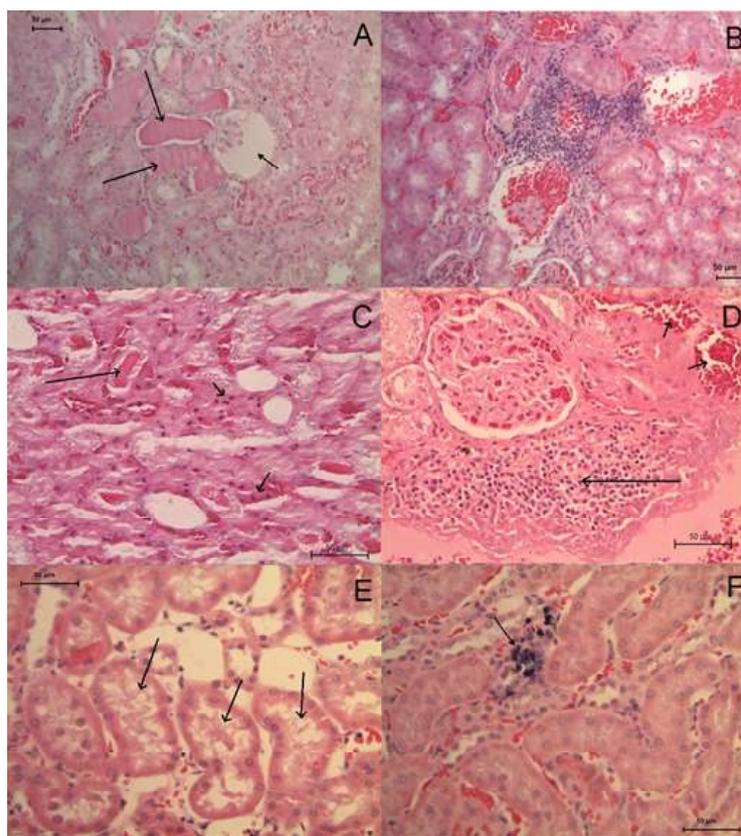


Figura 1. Alteraciones histopatológicas en riñones de roedores infectados naturalmente con *Leptospira* spp (A) señalado con flecha pequeña, glomérulo atrófico, con flechas largas, depósitos proteicos en túbulo renal. HE. 200x. (B) Infiltrado perivascular linfoplasmocitario y vasos congestionados. HE. 200x. (C) señalado con flechas pequeñas, necrosis tubular aguda, con flecha larga, depósito proteico en túbulo renal. HE. 400x. (D) señalado con flecha grande infiltrado intersticial linfoplasmocitario, con flecha pequeña, congestión. HE. 400x. (E) Señalado con flechas, degeneración vacuolar en túbulo renal. HE. 400x. (F) Señalado con flecha, depósito de calcio. HE. 400x

Las lesiones que predominaron fueron de carácter crónico, como la presencia de infiltrado linfocitario y plasmocitario. Estas son las lesiones más comúnmente encontradas en pacientes que presentan la infección por *Leptospira* spp (Jubb *et al.*, 2016; Seguel *et al.*, 2017). Debido a las lesiones que se generan en el roedor, se plantea la hipótesis de que esta especie se le categorice más como un portador sintomático de la bacteria que como un reservorio. Sin embargo, estas lesiones no se pueden atribuir específicamente a esta bacteria, debido a que los roedores pudiesen haber estado expuesto a otros agentes.

Pese a que en este estudio se encontraron múltiples lesiones histopatológicas relacionadas con la infección con *Leptospira* spp y las serologías resultaron positivas por la técnica MAT a este patógeno, no fue posible visualizar la bacteria por medio de la coloración Warthin Starry. Fornazari *et al.* (2012) evaluaron la eficiencia de la técnica Warthin-Starry para el diagnóstico de *Leptospira* spp en comparación con otras pruebas diagnósticas, esta prueba resulta ser de baja especificidad, donde los casos dados como negativos no aseguran que el animal no presente infección; y alta sensibilidad, ya que

Cuadro 1. Diagnóstico morfológico en riñones de 154 especímenes *Rattus norvegicus* seropositivos a *Leptospira* spp (Antioquia, Colombia, 2015)

Diagnóstico	Frecuencia ¹	
	n	%
Necrosis tubular	10	5.3
Pielitis crónica	13	6.9
Pielonefritis intersticial crónica	20	10.6
Nefritis intersticial crónica	85	45.0
Congestión vascular	38	20.1
Enfermedad proliferativa glomerular	17	9.0
Nefritis intersticial mixta	6	3.2

¹ En algunos casos se tuvo hasta dos tipos de diagnóstico

permite la visualización directa de la bacteria en el tejido animal. Otro estudio evaluó la eficiencia de esta técnica en bovinos, en la cual demostró también ser una técnica de baja especificidad, donde de 20 muestras positivas por otras técnicas, sólo 21.7% resultó positivo por Warthin-Starry (Mineiro *et al.*, 2011). Asimismo, en el estudio realizado por Agudelo-Flórez *et al.* (2013) con roedores en Medellín, Colombia, utilizando la tinción Warthin Starry se obtuvo 11.9% de positividad y utilizando PCR se obtuvo 68.7%.

CONCLUSIONES

- Las lesiones histopatológicas características de la infección por *Leptospira* spp, aunque sin poder ser de diagnóstico definitivo, sugieren fuertemente la presencia de este agente.
- Las lesiones histopatológicas y diagnósticos morfológicos microscópicos en roedores infectados con *Leptospira* spp son similares a los encontrados en animales que presentan la enfermedad.

- De esta investigación se concluye que, la tinción Warthin-starry no debe ser considerada una técnica de diagnóstico de rutina, debido a que si bien tiene una alta sensibilidad, presenta una baja especificidad.

Agradecimientos

Se agradece la Secretaría de Salud de Medellín por el apoyo en la captura y manipulación de los animales, y permitimos ser parte del grupo de trabajo.

LITERATURA CITADA

1. **Adler B, Moctezuma A. 2010.** Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287-296. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012
2. **Agudelo-Flórez P, Murillo VE, Londoño AF, Rodas JD. 2013.** Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with *Leptospira*. *Biomédica* 33: 82-88. doi: 10.7705/biomedica.v33i0.686
3. **Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJA, et al. 2008.** *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop* 105: 176-180. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.10.012
4. **Boey K, Shiokawa K, Rajeev S. 2019.** *Leptospira* infection in rats: a literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Negl Trop Dis* 13: 1-24. doi: 10.1371/journal.pntd.0007499
5. **Calderón A, Rodríguez V, Máttar S, Arrieta G. 2014.** Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod* 46: 427-432. doi: 10.1007/s11250-013-0508-y
6. **Carreño LA, Salas D, Beltrán KB. 2017.** Prevalencia de leptospirosis en Colombia: revisión sistemática de literatura. *Rev Salud Pública* 19: 204-209. doi: 10.15446/rsap.v19n2.54235

7. **Cruz-Céspedes MM. 2017.** Formulación de una guía de manejo y control de roedores en la empresa SINRESIDUOS S.A. en la ciudad de Bogotá. Bogotá. Colombia: Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 66 p.
8. **Da Silva JB, Carvalho E, Covarrubias AE, Ching ATC, Mattaraia VGM, Paiva D, et al. 2012.** Induction of TNF- α and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic *Leptospira*. *Microb Pathog* 52: 206-216. doi: 10.1016/j.micpath.2012.01.002
9. **Farouk WI, Hassan NH, Ismail TR, Daud IS, Mohammed F. 2018.** Warthin-Starry staining for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Malaysian J Med Sci* 25: 92–99. doi: 10.21315/mjms2018.25.4.9
10. **Fornazari F, Costa da Silva R, Richini-Pereira VB, Beserra HEO, Luvizotto MCR, Langoni H. 2012.** Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J Microbiol Methods* 90: 321-326. doi: 10.1016/j.mimet.2012.-06.005
11. **Goris MGA, Hartskeerl, RA. 2014.** Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Curr Protocol Microbiol (Supp 32)* 12E.5.1-12E.5.18. doi: 10.1002/978047-1729259.mc12e05s32
12. **Jubb K, Kenedy P, Palmer N. 2016.** Pathology of domestic animals Vol 2. 6th ed. Missouri, USA: Elsevier. p 376-464.
13. **Loffler SG, Pavan ME, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, et al. 2014.** Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp isolated from rodents in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 163-167. doi: 10.1590/0074-0276140295
14. **Martins G, Lilenbaum W. 2013.** The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. *BMC Vet Res* 9: 237-244. doi: 10.1186/1746-6148-9-237
15. **Mineiro ALBB, Vieira RJ, Costa ÉA, Santos RL, Gonçalves LMF, Carvalho SM, et al. 2011.** Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. *Pesq Vet Bras* 31: 859-866. doi: 10.1590/S0100-736X2011001000005
16. **[OMSA] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2023.** Código sanitario para los animales terrestres. [Internet]. Disponible en: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&-htmfile=sommaire.htm>
17. **[OMSA] Organización Mundial de la Salud. 2008.** Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. [Internet]. Disponible en: <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-Spa.pdf>
18. **Ramírez-García R, Agudelo-Flórez P, Acevedo-Sáenz L. 2019.** Inmunología de la leptospirosis. *Rec CES Med* 33: 192-200. doi: 10.21615/cesmedicina.-33.3.4
19. **Roqueplo C, Cabre O, Davoust B, Kodjo A. 2014.** Epidemiological study of animal leptospirosis in New Caledonia. *IJERPH* 11: 6000-6008. doi: 10.1155/2013/826834
20. **Seguel M, Muñoz F, Paredes E, Navarrete MJ, Gottdenker NL. 2014.** Pathological findings in wild rats (*Rattus rattus*) captured at Guafo Island, Northern Chilean Patagonia. *J Comp Pathol* 157: 163-173. doi: 10.1016/j.jcpa.2017.07.006
21. **Torres-Castro M, Guillermo-Cordero L, Hernández-Betancourt S, Gutiérrez-Ruiz E, Agudelo-Flórez P, Peláez-Sánchez R, et al. 2016.** First histopathological study in kidneys of rodents naturally infected with *Leptospira* pathogenic species from Yucatan, Mexico. *Asian Pac J Trop Med* 9: 145-147. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.-01.018

22. **Tucunduva de Faria M, Athanazioy DA, Goncalves Ramosy EA, Silvay EF, Reisy MG, Koy AI. 2007.** Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J Comp Path* 137: 231-238. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.08.001
23. **Villanueva SYAM, Saito M, Tsutsumi Y, Segawa T, Baterna RA, Chakraborty A, et al. 2014.** High virulence in hamsters of four dominant *Leptospira* serovars isolated from rats in the Philippines. *Microbiol* 160: 418-428. doi: 10.1099/mic.0.072439-0
24. **Yang CW. 2007.** Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney Int* 72: 918-925. doi: 10.1038/sj.ki.5002393