

Kejadian Leptospirosis pada Anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta

(CASE OF CANINE LEPTOSPIROSIS IN THE CITY OF YOGYAKARTA)

Guntari Titik Mulyani¹, Sri Hartati¹, Yuli Santoso²,
Kurnia², Agung Budi Pramono², Dyah Kunti Wirapratiwi²

¹Departemen Ilmu Penyakit Dalam,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,.

²Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi, FKH, UGM,
Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta, Indonesia 55281
Email: guntari@ugm.ac.id, telp. 08122721264

ABSTRAK

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis, yang disebabkan oleh *Leptospira interrogans*. Kejadian leptospirosis pada anjing bervariasi menurut wilayah dan musim, dan dianggap sebagai penyakit menular yang muncul pada manusia. Gejala klinis leptospirosis pada anjing sangat bervariasi, beberapa anjing tanpa menunjukkan gejala, dengan gejala ringan, dan yang lain berlanjut menjadi penyakit yang parah sampai kematian. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kasus leptospirosis pada anjing di Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta, dan mengidentifikasi serovar yang menginfeksi. Sebanyak 20 ekor anjing tanpa gejala, dengan gejala ringan, sampai gejala parah leptospirosis diambil serumnya guna pemeriksaan *Microscopic Agglutination Test* (MAT) yang dilaksanakan di Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitvet), Bogor. Sejarah vaksinasi dicatat sebagai bahan pertimbangan dalam menginterpretasi hasil pemeriksaan MAT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tiga dari 20 sampel positif leptospirosis. Satu sampel positif terhadap serovar *Bataviae*, satu sampel positif terhadap serovar *Bataviae* dan *Tarrasovi*, dan satu sampel lagi positif terhadap serovar *Bataviae*, *Tarrasovi*, *Ichterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Celledoni*, *Pyrogenes*, *Cynopteri*, dan *Rachmati*. Anjing yang positif leptospirosis menunjukkan gejala klinis yang sama berupa anoreksia, kelemahan, dan demam. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat kasus leptospirosis pada anjing di Yogyakarta yang penyebabnya dominan oleh *Leptospira interrogans* serovar *Bataviae*.

Kata-kata kunci: leptospirosis; *Leptospira*; anjing; DIY

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease, which is caused by *Leptospira interrogans*. The incidence of leptospirosis in dogs varies according to region and season, and is considered as emerging infectious diseases in humans. Clinical symptoms of leptospirosis in dogs vary greatly, some dogs are asymptomatic, with mild symptoms, and others progress to severe illness until death. The study aims to determine cases of canine leptospirosis in Yogyakarta, and identify the serovar that infect them. A total of 20 dogs without symptoms, with mild symptoms, to severe symptoms of leptospirosis were collected their serum and further tested using *Microscopic Agglutination Test* (MAT) conducted at the Center for Veterinary Research (BBLitvet) Bogor. History of vaccination is recorded as a consideration in interpreting the MAT results. The results showed that three out of the 20 samples were positive leptospirosis. Of the three positive samples, one was identified as serovar *bataviae*, another one as serovar *bataviae* and *tarrasovi*, and the last as serovar *bataviae*, *tarrasovi*, *ichterohaemorrhagiae*, *canicola*, *celledoni*, *pyrogenes*, *cynopteri*, and *rachmati*, respectively. The three dogs with leptospirosis showed similar clinical symptoms i.e. Anorexia, lethargy, and fever. It can be concluded that there are cases of canine leptospirosis in Yogyakarta which is predominantly caused by *Leptospira interrogans* serovar *bataviae*.

Key words: leptospirosis; *Leptospira*; dogs; Special Province of Yogyakarta (DIY)

PENDAHULUAN

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan oleh *Leptospira interrogans*, dan menginfeksi hampir semua mamalia. Spesies *L. interrogans* terdiri dari 23 serogroup dan 240 serotipe (serovar) (Bharti *et al.*, 2003). Leptospirosis pada anjing tersebar luas di seluruh dunia, dan anjing bertindak sebagai *incidental host* untuk berbagai serovar dan *maintenance hosts* untuk serovar *Canicola* dan *Bataviae* (Sykes *et al.*, 2011). Serovar *Leptospira* yang paling sering menimbulkan penyakit parah dan fatal pada manusia adalah serovar *Ichterohaemorrhagiae*, hewan peliharaan seperti anjing, kucing, sapi, domba, kambing, babi, maupun binatang liar seperti tikus, musang, dan tupai berperan sebagai reservoir (Sykes *et al.*, 2011). Infeksi *Leptospira* pada anjing oleh serovar *Ichterohaemorrhagiae* dan *Canicola* menyebabkan hepatitis akut atau subakut dan gangguan ginjal (Goldstein, 2010).

Lingkungan yang optimal untuk hidup dan perkembangbiakan *Leptospira* ialah pada suasana lembap, suhu sekitar 25°C, serta pH mendekati netral. Kondisi yang demikian merupakan keadaan yang selalu dijumpai di negeri-negeri tropik sepanjang tahun. *Leptospira* pada situasi tersebut dapat tahan hidup sampai beberapa minggu (Vijayachary *et al.*, 2008).

Leptospira masuk menginfeksi lewat kulit yang luka atau membran mukosa. *Leptospira* yang masuk tubuh, memperbanyak diri dan menyebar melalui aliran darah selanjutnya akan merusak dinding pembuluh darah kecil sehingga menimbulkan ekstrasvasi sel dan perdarahan. Kuman *Leptospira* hidup di ginjal dan air kemih hewan reservoir. Manusia dapat terinfeksi bakteri *Leptospira* karena kontak dengan air atau tanah yang terkontaminasi oleh urin atau cairan tubuh lainnya dari hewan yang terinfeksi *Leptospira*. (Bharadwaj, 2002).

Prevalensi leptospirosis anjing bervariasi menurut wilayah dan musim (Alton *et al.*, 2009). Laporan suatu penelitian di Michigan Amerika Serikat menunjukkan bahwa lebih dari 20% anjing klien yang sehat telah terinfeksi

Leptospira (Stokes *et al.*, 2007). Dalam studi lainnya dilaporkan bahwa 8,2% dari anjing yang terdedah *Leptospira* patogen memperlihatkan gejala klinis. Mengingat tingginya tingkat paparan *Leptospira*, maka leptospirosis harus dipertimbangkan pada anjing yang mengalami kelainan ginjal akut terlepas dari kondisi anjing, lingkungan ataupun geografi (Harkin, 2012).

Gejala klinis infeksi *Leptospira* pada manusia dan anjing sangat bervariasi, mulai gejala ringan atau tidak ada tanda-tanda penyakit, sampai menunjukkan gejala penyakit parah atau kematian (Van de Maele *et al.*, 2008; Saleem *et al.*, 2012). *Acute Kidney Injury* (AKI) adalah penyakit yang paling umum dikenal pada anjing, terhitung lebih dari 90% kasus yang dilaporkan adalah leptospirosis. Sebanyak 10-20% penyakit hati pada anjing terjadi secara bersamaan dengan AKI, tetapi juga dapat terjadi secara independen. Anoreksia, lesu, muntah, poliuria, dan polidipsia adalah tanda-tanda umum. Ikterus, demam, sakit perut, nyeri otot dan kekakuan, uveitis, dispnoea dan koagulopati terjadi juga tapi frekuensinya sedikit (Greene, 2008). Anjing bisa menjadi pembawa *Leptospira* asimtomatik setelah pulih dari infeksi akut. Anjing maupun manusia dapat terinfeksi dengan anggota serogrup yang sama, dengan demikian, ada kemungkinan bahwa anjing berfungsi sebagai sumber infeksi bagi manusia (Koizumi *et al.*, 2008).

Pada tahun 1980-an serovar *Ichterohaemorrhagiae* dan *Canicola* diidentifikasi sebagai serovar yang paling umum menyebabkan leptospirosis pada anjing. Pada tahun 1990, terjadi peningkatan insiden serovar *Grippityphosa* dan *Pomona*, dan menunjukkan kecenderungan berubah dalam epidemiologi penyakit leptospirosis ini. Perubahan-perubahan dalam prevalensi serovar diduga berhubungan dengan dua faktor utama yang sangat memengaruhi epizootologi dari serovar *Leptospira*, yaitu tindakan vaksinasi dengan serovar *Ichterohaemorrhagiae* dan *Canicola*, serta adanya migrasi dari satwa liar sebagai reservoir leptospirosis (Harkin, 2012). Seroprevalensi kasus leptospirosis pada anjing kintamani bali di Bali mencapai 18,18%, dan 90% di antaranya

positif terhadap serovar *Celledoni* (Mutawadiah, 2015). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi adanya kasus leptospirosis pada anjing, dan mengidentifikasi serovar penyebab leptospirosis pada anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan serum yang diambil dari 20 pasien anjing dengan berbagai tingkatan gejala, berupa: tanpa gejala (sehat), gejala anoreksia, kelemahan, dan demam, disertai dengan muntah, ikterus, dan gangguan ginjal. Sebanyak 3 mL sampel darah anjing diambil menggunakan spuit *disposibel* tanpa antikoagulan. Serum dipisahkan untuk pemeriksaan *Microscopic Agglutination Test* (MAT).

Sebelum MAT dilakukan, kultur *Leptospira* dimasukkan dalam tabung tes yang bersumbat dan ditambahkan 5-6 mL cairan medium *Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris* (EMJH) cair pada suhu 28-30°C. Kultur yang segar dapat dibuat dengan menginokulasikan 0,5 mL dari masing-masing serovar ke dalam tabung. Pada saat yang sama pemeriksaan dengan mikroskop lapang gelap terhadap kultur harus dilakukan untuk memastikan adanya *Leptospira* dan memastikan tidak adanya kontaminasi. Kultur diinkubasikan pada suhu 30°C dan diperiksa pertumbuhannya setelah 5-7 hari. Setelah 10 hari, kultur disimpan pada suhu 15°C. Kultur yang digunakan sebagai antigen harus dicek dengan antisera homolog MAT secara berulang untuk kualitas kontrol. Kultur yang baik dengan kepadatan 1-2 x 10⁸ per mL dapat digunakan sebagai antigen (BBalitvet, 2012).

Pemeriksaan MAT dilakukan dengan mengisi 96 sumuran pada *microtiter plate* dengan 50 μ L enceran serum dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sehingga terjadi perbandingan 1:25, dan sumuran selanjutnya diisi dengan volume yang sama hingga memiliki perbandingan serum dan PBS sebesar 1:50, 1:100, 1:400 dan 1:1600. Antigen *Leptospira* hidup (serovar : *Ichterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Celledoni*, *Ballum*, *Pyrogenes*, *Cynopteri*, *Rachmati*, *Auatralis*, *Pomona*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Bataviae*, *Hardjo*, *Tarrasovi*) sebanyak 0.05 mL ditambahkan, lalu diinkubasi pada suhu 28-30°C selama dua jam. Pembacaan hasil dilakukan di bawah

mikroskop medan gelap/fase kontras. Titik akhir pembacaan adalah 50% aglutinasi atau 50% *Leptospira* yang tidak teraglutinasi. Enceran akhir tertinggi serum dalam campuran serum-antigen yang menunjukkan 50% aglutinasi disebut titer. Pada uji ini digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif untuk masing-masing antigen yang digunakan direaksikan dengan antisera homolog. Untuk kontrol negatif, antigen diencerkan dengan PBS pH 7,5 menjadi 1:2, dan kontrol pembacaan 50% aglutinasi (+2) dibuat dengan mengencerkan antigen menjadi 1:4. Serum dengan titer 1:100 atau lebih terhadap salah satu serovar atau lebih dinyatakan positif (BBLitvet, 2012). Analisis data dilakukan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji MAT merupakan uji laboratorium tidak langsung yang bersifat tes spesifik serovar. Metode ini sangat umum digunakan untuk mendiagnosis leptospirosis pada hewan. Berdasarkan hasil MAT terhadap 20 sampel serum terdeteksi tiga sampel positif leptospirosis, yaitu: satu sampel positif terhadap delapan serovar, yaitu: *Ichterohaemorrhagiae* (1:100), *Celledoni* (1:100), *Canicola* (1:100), *Pyrogenes* (1:100), *Cynopteri* (1:100), *Rachmati* (1:100), *Bataviae* (1:100), dan *Tarrasovi* (1:400); satu sampel positif terhadap serovar *Bataviae* (1:400) dan serovar *Tarrasovi* (1:100); dan satu sampel positif terhadap serovar *Bataviae* (titer 1:100). Data selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

Serovar *Bataviae* telah menginfeksi ketiga anjing yang positif leptospirosis. Semua anjing-anjing tersebut telah divaksin dengan vaksin *Leptospira interrogans* yang berisi serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae*, namun tidak diperoleh informasi ketepatan waktu vaksinasinya.

Hasil penelitian ini memberikan gambaran bahwa serovar *Bataviae* adalah serovar *Leptospira* yang dominan menginfeksi anjing-anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta. Hasil ini berbeda dengan penemuan beberapa peneliti sebelumnya. Pada tahun 1980, serovar *Ichterohaemorrhagiae* dan *Canicola* diidentifikasi sebagai serovar yang paling umum menyebabkan Leptospirosis pada anjing. Pada kurun tahun 1990, terjadi peningkatan insiden serovar *Grippotyphosa* dan *Pomona*, dan menunjukkan kecenderungan berubah dalam epidemiologi penyakit leptospirosis ini (Harkin, 2012).

Tabel 1. Serovar *Leptospira interrogans* yang menginfeksi anjing-anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta.

Nama anjing/sampel	Pasien dari	Serovar	Titer MAT
Naca (A.9.)	RSH. Soeparwi	<i>Ichtero</i>	1:100
		<i>Celledoni</i>	1:100
		<i>Canicola</i>	1:100
		<i>Pyrogenes</i>	1:100
		<i>Cynoptery</i>	1:100
		<i>Rachmati</i>	1:100
		<i>Bataviae</i>	1:100
Jiji (A.10)	drh praktisi	<i>Tarrasovi</i>	1:100
		<i>Bataviae</i>	
Alto (A.16)	Klinik Calico	<i>Bataviae</i>	1:100

Keterangan: RSH= rumah sakit hewan; MAT= *Microscopic Agglutination Test*; drh = dokter hewan

Seroprevalensi kasus leptospirosis pada anjing kintamani bali di Bali mencapai 18,18%, dan didominasi serovar *Celledoni* (Mutawadiah, 2015). Perbedaan serovar yang dominan dalam suatu daerah dan kurun waktu tertentu menguatkan pendapat Gillespie dan Timoney (1981) yang menyatakan bahwa serovar yang dominan di suatu tempat tertentu dapat berbeda dengan daerah lain.

Menurut Martin *et al.* (2014) anjing yang divaksinasi dengan vaksin *Leptospira* memiliki titer MAT variabel dari waktu ke waktu, dan antibodi tidak boleh digunakan untuk memprediksi resistensi terhadap infeksi *Leptospira*. Titer MAT di atas 1:800 dapat berkembang setelah vaksinasi, dan kondisi ini dapat mempersulit diagnosis klinis leptospirosis. Satu ekor anjing pada penelitian ini memberikan hasil MAT positif terhadap serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae*, diduga titer 1:100 tercapai karena vaksinasi yang telah dilakukan.

Perubahan prevalensi serovar diduga berhubungan dengan dua faktor utama yang dapat sangat memengaruhi epizootologi dari serovar *Leptospira*, yaitu tindakan pencegahan berupa vaksinasi, serta adanya migrasi dari satwa liar sebagai reservoir leptospirosis (Ellis, 2010). Menurut Greene *et al.* (2008) reservoir utama *L. interrogans* serovar *Canicola* adalah anjing, sedangkan reservoir utama untuk serovar *Bataviae* adalah anjing, tikus, dan mencit. Koizumi *et al.* (2013) berpendapat bahwa untuk pencegahan leptospirosis disarankan tindakan vaksinasi dengan komposisi vaksin berdasarkan serovar lokal

dominan yang beredar, yang mungkin berbeda di berbagai wilayah dunia. Melihat kenyataan bahwa serovar *Bataviae* adalah serovar dominan penyebab leptospirosis pada anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta, maka sebaiknya vaksin *Leptospira* yang digunakan tidak hanya terhadap serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae* saja, tetapi juga terhadap serovar *Bataviae*.

Gejala klinis semua anjing yang positif leptospirosis pada penelitian ini berupa anoreksia, kelemahan, dan demam. Menurut Van de Maele *et al.* (2008) dan Saleem *et al.* (2012) gejala klinis infeksi *Leptospira* pada anjing sangat bervariasi. Beberapa anjing menampilkan gejala ringan atau tidak ada tanda-tanda penyakit, sedangkan yang lain berembang menjadi penyakit yang parah sampai kematian. Pada penelitian ini, dijumpai leptospirosis dengan gejala berupa muntah, ikterus dan gangguan ginjal pada anjing yang terinfeksi oleh *L. interrogans* serovar *Bataviae* dengan titer 1:400. Menurut Levett *et al.* (2001) leptospirosis memberikan respons inflamasi lokal maupun sistemik, dan pada setiap organ terjadi vaskulitis. Produksi sitokin oleh monosit, makrofag, serta sel-sel lain memberikan dampak gangguan permeabilitas vaskuler, penurunan tekanan darah, anoreksia, dan suhu tubuh yang turun-naik. Leptospirosis menyebabkan hipertrofi dan hiperplasia sel Kupffer disertai dengan kolestasis intrahepatik dalam organ hati (Burth *et al.*, 2005). Gangguan ginjal akibat infeksi leptospirosis merupakan komplikasi yang sering dan ditandai dengan

kerusakan pada interstitial dan tubular. Faktor utama yang terlibat dalam patogenesis gangguan ginjal akut karena leptospirosis adalah efek nefrotoksik langsung dari *Leptospira* dan toksin yang menginduksi respons imun. Jika penyakitnya berlanjut akan terjadi kematian karena uremia (Cerqueira *et al.*, 2008).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: terdapat kasus leptospirosis pada anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta yang ditandai dengan anoreksia, kelemahan, dan demam. Penyebab utama leptospirosis pada anjing di wilayah Daerah Istimewa Yogyakarta adalah *Leptospira interrogans* serovar *Bataviae*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian kasus leptospirosis pada anjing dan hewan lain dengan sampel yang lebih banyak pada batasan wilayah tertentu sehingga dapat diambil simpulan serovar penyebab yang dominan pada spesies dan wilayah tertentu. Vaksin *Leptospira* yang digunakan untuk vaksinasi anjing-anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta tidak hanya terhadap serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae* saja, tetapi juga terhadap serovar *Bataviae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terselenggara berkat bantuan: BPPTN FKH UGM; Pimpinan dan tim medis RSH. Prof. Soeparwi, Klinik Hewan Jogja, Klinik Hewan Calico, Klinik Hewan Kayu Manis, dan dokter hewan praktisi di wilayah DIY, serta pimpinan dan staf Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Untuk itu diucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Alton GD, Berke O, Rein_Smith R. 2009. Increase seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors. Ontario 1998-2006. *Can J Vet Res* 73: 167-175.
- BBalitvet. 2012. Pemeriksaan Leptospirosis secara Laboratoris. Bogor Laboratorium Leptospira Balai Penelitian Veteriner. Hlm. 1-6.
- Bharadwaj L, Bal AM, Joshi SA, Kagal A. 2002. Leptospirosis in Human. *India Jpn J Insect Dis* 55: 194-196.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gillman RH, Willing MR. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Dis* 3: 757-771.
- Burth P, Younes-Ibrahim M, Santos MC, Castro-Faria NHC, De-Casto FMV. 2005. Role of nonesterified fatty acids in pathophysiological processes of leptospiral infection. *J Infect Dis* 191(1): 51-57.
- Cerqueira TB, Athanazio DA, Spichler AS, Seguro AC. 2008. Renal involvement in leptospirosis new insights into pathophysiology and treatment. *Braz J Infect Dis* 12: 248-252.
- Ellis WA 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec* 167: 602-605.
- Gillespie JH, Timoney JF. 1981. The Genus *Leptospira* in: *Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals*. Ithaca and London: Cornell University Press. Hlm. 64-66.
- Goldstein RA. 2010. Canine Leptospirosis. *Vet Clin North Am Small Anim Prac* 40: 1091-1101.
- Greene GC, Sykes JE, Brown CA, Hartmann K. 2008. Leptospirosis. Dalam Greene CE Editor. *Infection disease of dogs and cats*. Missouri: Saunders Elsevier. Hlm. 402-417.
- Harkin KR. 2012. Canine leptospirosis: A perspective on recent trend. *Today Veterinary Practice* 2(4): 27-33.
- Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. 2003. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospirae in dogs. *J Am Vet. Med Assoc* 222(9): 1230-1233.
- Koizumi N, Muto M, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S, Funatsumaru S, Ohnishi M. 2013. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs. *Japan J Med. Microbiol* 62: 630-636.

- Koizumi N, Muto M, Yamamoto S, Baba Y, Kudo M, Tamae Y, Shimomura K, Takatori I, Iwakiri A. 2008. Investigation of reservoir animals of *Leptospira* in the northern part of Miyazaki Prefecture. *Japan J Infect Dis* 61: 465-468.
- Levett PN, Branch SL, Whittington CV, Edward LN, Paxton H. 2001. Two methods for rapid diagnostic of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 349-351.
- Martin LER, Wiggans KT, Wennagle SA, Curtis K, Chandrashekar R, Lappin MR. 2014. Vaccine-associated leptospira antibodies in client owned dogs. *J Vet Int Med* 28(3): 789-792.
- Mutawadiah. 2015. Seroprevalensi Leptospirosis pada Anjing Kintamani di Bali. *Tesis*. Denpasar. Universitas Udayana..
- Saleem MH, Khan MS, Khan MA, Ijaz M, Hassan A, Mehmood K. 2013. Serosurveillance of canine leptospirosis under different climatic conditions in and around Lahore, Pakistan. *Pak Vet J* 33: 241-243.
- Stokes JE, Kanenee JB, Schall WD. 2007. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovar in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* 230(11): 1657-1664.
- Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2011. ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: Diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Int Med* 25: 1-13.
- Tangeman LE, Littman MP. 2013. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 Cases (2000–2010). *J Am Vet. Med Assoc* 243: 1316-1322.
- Van de Maele I, Claus A, Haesebrouck F, Daminet D. 2008. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec* 163: 409-413.
- Vijayachari PAP, Sugunan AN, Shriram. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problems, *J Biosci* 33(4): 557-569.