

Identifikasi Serovar Penyebab Leptospirosis pada Anjing di Yogyakarta

Identification of Serovar that Caused Canine Leptospirosis in Yogyakarta

Guntari Titik Mulyani^{1*}, Sri Hartati¹, Hastari Wuryastuti¹, Ida Tjahajati¹, Yuriadi¹, Irkham Widiyono¹, Yanuartono¹, Hary Purnamaningsih¹, S Indarjulianto¹, Slamet Raharjo¹, Alfariza Nururozi¹, Angeline Ganapragasam², Yeo Suan Jiao²

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

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281

*Email: guntari@ugm.ac.id

Naskah diterima: 28 September 2018, direvisi: 26 Juli 2019, disetujui: 30 November 2019

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease of global concern, and is caused by pathogenic serovar *Leptospira interrogans*. Canine Leptospirosis is widespread worldwide, dogs can act as incidental hosts or maintenance hosts for various serovars. The purpose of this-research was to identify leptospire serovars that infect healthy and suspected leptospirosis dogs in Yogyakarta. A total of 56 dogs (36 healthy dogs and 20 suspect leptospirosis dogs) sera were taken from cephalic vein as much as 3 ml. Sera were examined for leptospirosis with Microscopic Agglutination Test (MAT) which conducted at the Research Center for Veterinary Science, Bogor. Microscopic Agglutination Test carried out on various Leptospire serovar, namely: Ichterohaemorrhagiae, Javanica, Celledoni, Ballum, Pyogenes, Cynopteri, Rachmati, Australis, Pomona, Canicola, Grippytyphosa, Bataviae, Hardjo, and Tarrasovi. The results showed that Celledoni serovars infected 25% of healthy dogs and 5% of suspect leptospirosis dogs, Javanica serovar infected 19% of healthy dogs, Bataviae serovars infected 15% of suspect leptospirosis dogs, Grippytyphosa serovar infected 11% of healthy dogs, Tarrasovi serovar infected 10% of suspect leptospirosis dogs, serovars Cynopteri infects 5% of healthy dogs and 5% of suspect leptospirosis dogs, serovar Pyogenes infects 5% of healthy dogs and 5% of suspect leptospirosis dogs, and serovar Rachmati infects 5% of suspect leptospirosis dogs. Seven healthy dogs (19%) and 2 suspect leptospirosis dogs (10%) were infected with more than 2 leptospire serovars. From the results of this study it can be concluded that Celledoni serovar of *Leptospira interrogans* infection causes subclinical leptospirosis, while Bataviae serovar infection causes clinical leptospirosis in dogs in Yogyakarta.

Key words: Bataviae; Celledoni; leptospira; leptospirosis; MAT, serovar

Abstrak

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang menjadi perhatian global, dan disebabkan oleh serovar patogen *Leptospira interrogans*. Leptospirosis pada anjing tersebar luas di seluruh dunia, anjing dapat berperan sebagai *incidental host* ataupun *maintenance hosts* untuk berbagai serovar. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi serovar leptospira yang menginfeksi anjing sehat maupun anjing terduga leptospirosis di Yogyakarta. Penelitian ini menggunakan serum yang diambil dari 56 ekor anjing di Yogyakarta, yang terdiri dari 36 anjing tanpa gejala leptospirosis (sehat) dan 20 anjing dengan gejala leptospirosis (sakit). Serum dikoleksi untuk pemeriksaan *Microscopic Agglutination Test* (MAT) yang dilaksanakan di Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitvet), Bogor. Uji dilakukan terhadap 14 serovar leptospira, yaitu: Ichterohaemorrhagiae, Javanica, Celledoni, Ballum, Pyogenes, Cynopteri, Rachmati, Australis, Pomona, Canicola, Grippytyphosa, Bataviae, Hardjo, dan Tarrasovi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa serovar Celledoni menginfeksi 25% anjing sehat dan 5% anjing sakit, serovar Javanica meninfeksi 19% anjing sehat, serovar Bataviae menginfeksi 15% anjing sakit, serovar Grippytyphosa menginfeksi 11% anjing sehat, serovar Tarrasovi menginfeksi 10% anjing sakit, serovar Cynopteri menginfeksi 5% anjing sehat dan 5% anjing sakit, serovar Pyogenes menginfeksi 5% anjing sehat dan 5% anjing sakit, dan serovar Rachmati menginfeksi 5% anjing sakit. Tujuh ekor anjing sehat (19%) dan dua ekor

anjing sakit (10%) terinfeksi lebih dari dua serovar leptospira. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa infeksi *Leptospira interrogans* serovar Celledoni menyebabkan terjadinya leptospirosis subklinis, sedangkan infeksi serovar Bataviae menyebabkan leptospirosis klinis pada anjing-anjing di Yogyakarta.

Kata Kunci: Bataviae; celledoni; leptospira; leptospirosis; MAT; serovar

Pendahuluan

Leptospirosis adalah zoonosis yang menginfeksi manusia, hewan piaraan dan satwa liar dan disebabkan oleh berbagai serovar *Leptospira interrogans* (Lizer *et al.*, 2017). Spesies *L. interrogans* terdiri dari 23 serogroup dan 240 serovar (Bharti *et al.* 2003). Serovar leptospira memiliki spesies hewan tertentu sebagai hospes alami, tetapi hewan dan manusia dapat terinfeksi dengan berbagai jenis serovar. Setiap serovar beradaptasi kepada satu atau lebih hospes sebagai hospes primer, yang disebut sebagai hospes definitif, atau hospes reservoir. Hospes reservoir teradaptasi dapat mengalami infeksi persisten, tanpa gejala klinis yang berat, dan dapat mengeluarkan leptospira dalam urin dari beberapa bulan hingga beberapa tahun setelah infeksi. Hospes insidental dapat terinfeksi oleh serovar dan belum beradaptasi dengan hospes tersebut, sehingga cenderung mengalami gejala klinis dan jarang menjadi *carrier* kronik (Markey *et al.*, 2013). Anjing adalah hospes reservoir untuk *L. interrogans* serovar Canicola (Goldstein, 2010). Mulyani *et al.* (2017) melaporkan bahwa serovar Bataviae adalah serovar dominan yang menyebabkan leptospirosis klinis pada anjing-anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta.

Leptospira memasuki hospes yang rentan secara langsung dari urin atau secara tidak langsung dari air, tanah, atau lumpur yang terkontaminasi. Penularan leptospira pada anjing selain lewat kelamin dan plasenta, juga melalui luka gigitan (Dziezyc, 2000). Leptospira dapat menembus kulit yang luka dan mukosa yang utuh seperti konjungtiva. Leptospira dengan cepat masuk ke dalam tubuh sehingga dapat ditemukan dalam aliran darah beberapa menit setelah inokulasi subkutan, intraperitoneal atau intramuskular. Motilitas leptospira memfasilitasi penyebarannya melalui jaringan (Adler, 2014).

Infeksi leptospira patogenik dapat menyebabkan berbagai manifestasi klinis dari subklinis hingga berat, dan penyakit yang berpotensi letal (Saleem *et al.*, 2013). Major *et al.* (2014) memberikan gambaran

manifestasi klinis leptospirosis akut pada organ utama: 99,7% menunjukkan keterlibatan ginjal, 35,4% keterlibatan hati (seperti yang ditunjukkan oleh hiperbiliruemia hepatik), 68,8% keterlibatan pulmo dan 18,4% menunjukkan tanda-tanda yang konsisten dengan koagulasi intravaskular diseminata. *Leptospira* melokalisasi di tubulus ginjal proksimal dan dibuang lewat urin setelah periode leptospiroemia. Durasi dan intensitas *shedding* dalam urin bervariasi dari anjing ke anjing dan dengan serovar yang menginfeksi. Infeksi dengan serovar Canicola biasanya menghasilkan *shedding* jangka panjang, yang dapat berlangsung hingga dua tahun. Anjing yang terinfeksi dengan serovar lainnya biasanya membuang organisme tersebut lewat urin mereka untuk waktu yang lebih singkat (Greene, 2012).

Serovar Icterohaemorrhagiae, Copenhageni dan Pomona menginduksi penyakit hati yang paling parah. Serovar Canicola dan Grippotyphosa menyebabkan beberapa tanda klinis yang terkait dengan hati (Langston and Heuter, 2003). Hubungan antara serovar yang menginfeksi dan penyakit klinis tidak didefinisikan dengan baik. Contohnya, infeksi dengan serovar Bratislava dapat bersifat subklinis, dapat menyebabkan gagal ginjal akut, atau dapat mengakibatkan gagal ginjal dan juga hati (Goldstein *et al.*, 2010). Mulyani *et al.* (2017) melaporkan adanya ikterik dan gangguan ginjal pada anjing yang terinfeksi serovar Bataviae.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi tingkat kejadian dan jenis serovar *Leptospira interrogans* yang sering menginfeksi pada anjing-anjing di Yogyakarta, serta mempelajari efek klinis yang ditimbulkan oleh serovar penyebab leptospirosis pada anjing-anjing di Yogyakarta. Hasil penelitian ini akan sangat bermanfaat bagi para praktisi hewan kecil dalam menetapkan diagnosis leptospirosis pada anjing. Serovar dominan penyebab leptospirosis klinis dapat dipertimbangkan dalam program vaksinasi leptospirosis pada anjing.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan serum yang diambil dari 56 anjing yang terdiri dari 36 anjing sehat dan 20 anjing yang memiliki gejala klinis leptospirosis (anoreksia, demam, muntah disertai/tidak gangguan fungsi hati dan ginjal). Darah diambil sebanyak 3 ml dan serum dipisahkan untuk uji laboratorium. Sejarah vaksinasi dicatat sebagai bahan pertimbangan dalam menginterpretasikan hasil.

Sebelum MAT dilakukan, kultur dari 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 dicek 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 µl enceran serum sampel dengan 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*, *Pyogenes*, *Cynopteri*, *Rachmati*, *Australis*, *Pomona*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Bataviae*, *Hardjo*, *Tarrasovi*) sebanyak 0.05 ml ditambahkan, lalu diinkubasi pada suhu 28-30°C selama 2 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 (Bbalitvet, 2012).

Hasil Dan Pembahasan

Microscopic Agglutination Test digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik serovar leptospira. Serovar yang bereaksi dengan serum pasien dikatakan serovar infeksi (Chirathaworn *et al.*, 2014). Dari MAT dengan 14 jenis serovar leptospira memberikan hasil hasil positif pada 16 (44%) anjing sehat, dan 3 (15%) anjing sakit. Pada kelompok anjing sehat terdapat 9 anjing positif terhadap 1 serovar (56%), 6 anjing positif terhadap 2 serovar (38%), dan 1 anjing positif terhadap 3 serovar (6%). Pada kelompok anjing sakit terdapat 1 anjing positif terhadap 1 serovar, 1 anjing positif terhadap 2 serovar dan 1 anjing positif terhadap 6 serovar. Seropositif terhadap beberapa serovar mungkin merupakan konsekuensi dari tes tunggal, tetapi tidak dapat membedakan antara reaksi silang dan koinfeksi. Dalam kasus koinfeksi *sensu stricto*, hewan mungkin telah terinfeksi oleh serogrup yang berbeda selama periode yang sama dan dalam kasus koinfeksi *sensu lato*, hewan mungkin telah terpapar dengan serogrup sebelumnya dan kemudian terpapar serogrup lain yang menghasilkan sampel positif terhadap serogrup yang banyak (Chadsuthi *et al.*, 2017). Hasil MAT serum anjing dan serovar yang memberikan hasil positif disajikan pada Tabel 1.

Anjing dalam penelitian ini seluruhnya telah divaksin dengan vaksin leptospira yang berisi serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae*. Hasil titer antibodi dari serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae* tidak dianalisis dalam penelitian ini karena uji MAT tidak mampu membedakan antibodi yang diperoleh dari vaksin atau infeksi. Serovar *Celledoni*, *Javanica* dan

Tabel 1. Serovar leptospira yang memberikan hasil positif dengan MAT

| No | Serovar positif | Anjing sehat | Anjing sakit | Jumlah |
|----|-----------------|--------------|--------------|--------|
| 1 | Celledoni | 9 | 1 | 10 |
| 2 | Javanica | 7 | 0 | 7 |
| 3 | Grippotyphosa | 4 | 0 | 4 |
| 4 | Bataviae | 0 | 3 | 3 |
| 5 | Cynopteri | 2 | 1 | 3 |
| 6 | Pyogenes | 2 | 1 | 3 |
| 7 | Tarrasovi | 0 | 2 | 2 |
| 8 | Rachmati | 0 | 1 | 1 |

Grippytyphosa adalah serovar leptospira dominan yang menginfeksi anjing-anjing sehat di Yogyakarta. Serovar yang menyebabkan penyakit pada hewan bervariasi antar negara dan terkadang antar wilayah di negara yang sama. Biasanya sebagian besar infeksi pada hewan domestik, di wilayah tertentu, disebabkan oleh hanya beberapa serovar (Markey *et al.*, 2013). Di Bali serovar Celledoni adalah serovar yang dominan pada anjing Kintamani, namun tidak menimbulkan gejala klinis (Mutawadiah *et al.*, 2015). Serovar Celledoni menginfeksi dan menimbulkan gejala klinis pada tikus dan keledai (Samir *et al.*, 2015). Serovar Javanica menimbulkan penyakit pada tikus (Ramadhani *et al.*, 2015). Serovar Grippytyphosa menimbulkan penyakit pada rodensia, sapi, babi, domba, kambing, kelinci dan beberapa satwa liar seperti tupai, landak dan musang (Greene, 2012). Pada sapi, kerbau, domba, kambing dan babi, serovar Pyrogenes dapat menyebabkan Leptospirosis (Himani *et al.*, 2013). Kelelawar dan rodensia biasanya terinfeksi oleh serovar Cynopteri (Ramadhani *et al.*, 2015 ; Conover dan Vail, 2015).

Pada kelompok anjing sakit terdapat satu sampel positif terhadap serovar Bataviae, satu sampel positif terhadap serovar Bataviae dan Tarrasovi, dan satu sampel lagi positif terhadap serovar Bataviae, Tarrasovi, Celledoni, Cynopteri, Pyrogenes, dan Rachmati. Serovar Bataviae merupakan serovar dominan yang terdeteksi pada kelompok anjing sakit. Efek yang ditimbulkan karena infeksi leptospira bervariasi dan tergantung kepada virulensi, serovar, serta jumlah bakteri yang menginfeksi hospes (Greene, 2012). Anjing yang pernah terinfeksi oleh serovar yang sama akan memiliki kekebalan (Klaasen *et al.*, 2003). Menurut Azocar-Aedo *et al.* (2014) anjing menjadi hospes reservoir utama bagi serovar Canicola dan Bataviae dan menjadi hospes intermediate bagi serovar Hardjo, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bratislava, dan Bataviae.

Kelompok anjing sakit dengan MAT positif memperlihatkan gejala klinis berupa kelemahan, anoreksia, muntah dan demam. Dua anjing yang positif terhadap lebih dari satu serovar menunjukkan gejala ikterik dan gangguan fungsi ginjal. Kedua anjing ini tidak tertolong dan berakhir dengan kematian, sedangkan anjing yang positif terhadap serovar Bataviae saja dapat diselamatkan. Menurut Van de Maele *et al.* (2008) dan Saleem *et al.* (2013) gejala klinis infeksi leptospira pada anjing sangat bervariasi. Beberapa anjing menampilkan gejala ringan atau

tidak ada tanda-tanda penyakit, sedangkan yang lain berkembang menjadi penyakit yang parah sampai kematian. Leptospirosis menyebabkan hipertrofi dan hiperplasia sel Kupffer disertai dengan kolestasis intrahepatik dalam organ hati (Greene, 2012). Derajat ikterus biasanya berhubungan dengan keparahan nekrosis hati. Anjing berusia kurang dari enam bulan sangat rentan terhadap insufisiensi hati berat (Langston and Heuter 2003, Greene, 2012). Kelainan pada ginjal terjadi akibat kompleks imun serta efek toksik langsung dari leptospira yang merusak tubulus, vaskulitis, kerusakan endotel, terjadi hipoksemia, nefritis interstisial, nekrosis tubuler akut. Nefritis dan nekrosis tubuler akut, keduanya diakibatkan akibat migrasi leptospira ke dalam ginjal serta deposisi antigen leptospira pada glomerulus dan tubulus yang mengakibatkan terjadinya gagal ginjal dan kematian (Nasronudin *et al.*, 2007).

Kesimpulan

Leptospira interrogans serovar Celledoni merupakan serovar dominan penyebab leptospirosis subklinis, *Leptospira interrogans* serovar Bataviae merupakan serovar dominan penyebab leptospirosis klinis pada anjing-anjing di Yogyakarta. Pada kasus leptospirosis klinis, semakin banyak serovar yang menginfeksi anjing, semakin meningkatkan risiko kematian.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini terselenggara berkat bantuan beberapa pihak, untuk itu diucapkan terima kasih kepada: Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UGM atas persetujuan dana BPPTN FKH UGM yang membiayai penelitian ini; tim Ilmu Penyakit Dalam atas kerjasamanya, dokter hewan praktisi di wilayah Yogyakarta atas bantuan sampel penelitian; serta pimpinan dan staff BBalitvet Bogor atas analisis laboratorium yang dilakukan.

Daftar Pustaka

- Adler, B. 2014. Pathogenesis of Leptospirosis: Cellular and Molecular Aspects. *Journal of Veterinary Microbiology*. 172: 353-358.
- Anonim. 2012. Pemeriksaan Leptospirosis secara Laboratoris. *Laboratorium Leptospira Balai Penelitian Veteriner*, Bogor.

- Azocarr-Aedo, L., Smits, H.L. & Monti, G. 2014. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. *Arch Med Vet.* 46: 337-348.
- Chadsuthi, S., Bicout, D.J., Wiratsudakui, A., Suwancharoen, D., Petkanchanapong, W., Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P. and Chalvet-Monfray, K. 2017. Investigation on Predominant *Leptospira* Serovars and its Distribution in Humans and Livestock in Thailand, 2010-2015. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 11(2): 1-18.
- Chirathaworn, C., Inwattana, R., Poovorawan, Y., and Suwancharoen, D. 2014. Interpretation of Microscopic Agglutination Test for Leptospirosis Diagnosis and Seroprevalence. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 4: 162-164.
- Conover, M.R. and Vail, R.M. 2015. *Human Diseases from Wildlife.* CRC Press. Florida. 180.
- Dziezyc, J. 2000. Canine Systemic Bacterial Infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 30: 1103-1117.
- Goldstein, R.E. 2010. Canine Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 40 (6): 1091-1101.
- Greene, C.E. 2012. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed. Saunders Elsevier. St. Louis, Missouri. USA: 433-462.
- Himani, D., Suman, M.K. and Mane, B.G. 2013. Epidemiology of Leptospirosis: An Indian Perspective. *Journal of Foodborne and Zoonotic Diseases.* 1 (1): 6-13.
- Klaasen, H.L., Molkenboer, M.J., Vrijenhoek, M.P., and Kaashoek, M.J. 2003. Duration of immunity in dogs vaccinated against Leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine, *Vet Microbiol.* 95(1-2), 121-132
- Langston, C.E. and Heuter, K.J. 2003. Leptospirosis: A Re-emerging Zoonotic Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 33: 791-807.
- Lizer, J., Grahlmann, M., Hapke, H., Velineni, S., Lin, D., and Kohn, B. 2017. Evaluation of Rapid IgM Detection Test for Diagnosis of Acute Leptospirosis in Dogs. *Veterinary Record.* 1- 5.
- Major, A., Schweighauser, A. and Francey, T. 2014. Increasing Incidence of Canine Leptospirosis in Switzerland. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 11: 7242-7260.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault., M., Cullinane, A. and Maguire, D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology.* 2nd ed. Mosby Elsevier. Missouri, USA.
- Mulyani, G.T., Hartati, S., Santoso, Y., Kurnia, Pramono, A.B. and Wirapratwi, D.K. 2017. Kejadian Leptospirosis pada Anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta. *Jurnal Veteriner.* 18 (3): 403-408.
- Mutawadiah, Puja, IKP. dan Dharmawan, NS. 2015. Seroprevalensi Leptospirosis pada Anjing Kintamani di Bali. *Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan.* 3 (2): 41-44.
- Nasronudin, Usman, H., Vitanata, Erwin, AT., Bramantono, Suharto, dan Eddy, S. 2007. *Penyakit Infeksi di Indonesia, Solusi Kini dan Mendatang.* Airlangga University Press, Surabaya.
- Ramadhani, T., Widyastuti, D. dan Priyanto, D. 2015. Determinasi Serovar Bakteri *Leptospira* pada Reservoir di Kabupaten Banyumas. *Jurnal Ekologi Kesehatan.* 14 (1) : 8-16.
- Saleem, M.H., Khan, M.S. Khan, M.A., Khan, M.A., Ijaz, M., Hassan, A., and Mehmood, K. 2013. Serosurveillance of canine leptospirosis under-different climatic conditions in and around Lahore, Pakistan. *PakVet J.* 33: 241-243.
- Samir, A., Soliman, R., El-Hariri, M., Abdel-Moein, K. and Hatem, ME. 2015. Leptospirosis in Animals and Human Contacts in Egypt: Broad Range Surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48 (3): 272-277.
- Van de Maele, I., Claus, A. Haesebrouck, F., and , Daminet, S. 2008. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec.* 163: 409-413.