

Leptospirose canina associada à insuficiência renal aguda - Relato de caso*

Roberta Torres Chideroli¹⁺, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense²,
Luisa Padovani³, Lisiane de Almeida Martins⁴, Daniela Dib Gonçalves⁵
e Julio Cesar de Freitas⁶

ABSTRACT. Chideroli R.T., Bracarense A.P.F.R.L., Padovani L., Martins L. de A., Gonçalves D.D. & de Freitas J.C. [**Canine leptospirosis associated with acute renal failure - Case report.**] Leptospirose canina associada à insuficiência renal aguda - Relato de caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.1):79-84, 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Londrina, PR 86057-970, Brasil. E-mail: robertaa_tc@hotmail.com

Leptospirosis is caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, affecting several animal species, including humans. Carrier animals are considered the main source of transmission because these bacteria are located in the renal tubules and are excreted in the urine for a variable period of time. Due to the variety of clinical signs the leptospirosis is a disease of difficult diagnosis requiring laboratory tests for confirmation. The aim of this study was to describe a dog with acute symptoms of failure kidney and high titer of antibodies against serovar *Canicola*. The diagnosis was confirmed by microscopic agglutination test (MAT), polymerase chain reaction (PCR) and histological kidney analysis by silver staining method (Warthin Starry) associated with the clinical pathology tests (complete blood count, urinalysis and biochemical profile).

KEY WORDS. *Leptospira* spp., dog, urine.

RESUMO. A leptospirose é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* e acomete diversas espécies animais, incluindo os humanos. Os animais portadores são considerados a principal fonte de transmissão da doença, pois as leptospirosas se localizam nos túbulos renais e são excretadas na urina por um período de tempo variável. Devido à variedade de sinais clínicos a leptospirose é uma doença de difícil diagnóstico necessitando de exames laboratoriais para sua confirmação.

O objetivo deste trabalho foi descrever um cão com quadro clínico agudo de insuficiência renal e hepática e alto título de anticorpos contra o sorovar *Canicola*. O diagnóstico foi confirmado pelas técnicas de soroprecipitação microscópica (SAM), reação em cadeia de polimerase (PCR) e análise histológica do rim através da impregnação pela prata (Warthin Starry), associadas aos exames da patologia clínica (hemograma, urinálise e bioquímica sérica).

*Recebido em 21 de março de 2016.

Aceito para publicação em 9 de maio de 2016.

¹ Médica-veterinária. MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Londrina, PR 86057-970. *Autor para correspondência, E-mail: robertaa_tc@hotmail.com

² Médica-veterinária. DSc, Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Londrina, PR 86057-970. E-mail: anapaula@uel.br

³ Médica-veterinária. Residente em Clínica Médica de Animais de Companhia, Departamento de Clínicas Veterinárias, UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Londrina, PR 86057-970. E-mail: luisapadovani1@hotmail.com

⁴ Médica-veterinária. DSc, Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública (LMVPSP), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Paranaense (UNIPAR), Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, Zona III, Umuarama, PR 87502-210. E-mail: lisiane.almeida.martins@gmail.com

⁵ Médica-veterinária. DSc, LMVPSP, DMVP, UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, Zona III, Umuarama, PR 87502-210. E-mail: danieladib@unipar.br

⁶ Médico-veterinário. DSc, Laboratório de Leptospirose, DMVP, UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Londrina, PR 86057-970. E-mail: freitasj@uel.br

PALAVRAS-CHAVE. *Leptospira* spp., cão, urina.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é considerada uma doença infectocontagiosa, de importância mundial, causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Tanto animais domésticos como silvestres podem se tornar portadores e contribuir para a disseminação da doença (Adler & de la Peña Moctezuma 2010). A leptospirose é uma doença de importante repercussão na saúde pública e o cão no meio urbano é uma das principais fontes para a transmissão da doença devido ao estreito convívio com ser humano (Batista et al. 2004).

A infecção do hospedeiro geralmente ocorre por meio do contato com leptospirosas no ambiente por meio de água e alimento contaminados com urina, fômites ou carcaça de animais infectados. As leptospirosas ficam albergadas nos túbulos renais dos animais conhecidos como hospedeiros de manutenção, e o cão é considerado o hospedeiro de manutenção do sorovar *Canicola* (Greene et al. 2006). A incidência da leptospirose nos cães considerados portadores renais crônicos é desconhecida. Este estado provavelmente ocorra especificamente para aqueles animais infectados com o sorovar *Canicola*, e é menos provável que este estado de portador exista em cães infectados com outros sorovares não adaptados a espécie canina (Goldstein 2010).

Martins et al. (2013) em um estudo de incidência em cães da área metropolitana de Curitiba, Paraná, observaram que houve um aumento na prevalência de animais reagentes na soroaglutinação microscópica (SAM) e que a idade dos cães é um importante fator de risco para a leptospirose canina. Além disso, a presença de fatores ambientais como alterações climáticas, problemas no recolhimento de resíduos e episódios de chuva forte, também são altamente favoráveis para a propagação da infecção nesta espécie (Chetta et al. 2014).

As leptospirosas multiplicam-se ativamente nos diferentes órgãos parenquimatosos, sangue, linfa e líquido, caracterizando o quadro agudo da doença, denominado leptospiremia. A inflamação inicial causa injúria renal e hepática e sua recuperação dependerá da produção elevada de anticorpos específicos frente ao sorovar infectante (Zhang et al. 2009). A colonização do epitélio tubular renal caracteriza a fase de leptospirúria onde as leptospirosas são eliminadas na urina do hospedeiro de manutenção de forma intermitente desde 72 horas após a infecção até semanas a meses nos animais domésticos e por toda vida nos roedores (Levett 2001).

Os sinais clínicos iniciais da leptospirose em cães são variáveis incluindo a associação de anorexia, letargia, depressão, febre e variado grau de envolvimento hepático, pulmonar e renal (Sykes et al. 2011, Tangeman et al. 2013). Além disso, alguns cães podem exibir sinais leves da doença, enquanto outros desenvolvem doença grave ou morte (Saleem et al. 2012). Estes sinais, mesmo quando característicos, não são patognomônicos, impedindo que o diagnóstico clínico seja conclusivo (Faine et al. 1999), necessitando de exames laboratoriais para sua confirmação. As dosagens de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e bilirrubina constituem-se nos principais exames de monitoramento da evolução do quadro clínico e, conseqüentemente, do prognóstico de animais com leptospirose (Van De Maele et al. 2008).

O diagnóstico clínico da leptospirose é baseado no histórico epidemiológico, no quadro clínico de caráter sistêmico, incluindo anorexia, prostração, desidratação, icterícia e, nas alterações laboratoriais indicativas de comprometimento renal e hepático. Os testes baseados na detecção de anticorpos podem ser utilizados para o diagnóstico, mas eles têm baixa sensibilidade na fase inicial da doença e os anticorpos induzidos pela vacinação não podem ser discriminados daqueles produzidos na infecção natural (Xu et al. 2014). Na rotina clínica, a confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico é através da pesquisa de anticorpos específicos no soro, por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM) (Levett 2001). Outras técnicas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) têm sido utilizadas para identificar o material genético de leptospirosas na urina. A falta de títulos mensuráveis na SAM sugere que alguns casos são detectados cedo, antes da soro-conversão ou que os animais foram infectados por um sorovar não testado na SAM. Portanto, para um diagnóstico mais preciso, é importante também a realização da PCR nos casos suspeitos (Wilson et al. 2015).

O exame post-mortem pode ser extremamente valioso no diagnóstico da leptospirose em cães, porém os achados anatomopatológicos variam de acordo com a sintomatologia clínica desenvolvida (Geisen et al. 2007). Em animais cronicamente infectados, as alterações da função renal nem sempre se correlacionam com a gravidade das alterações histológicas (Greene et al. 2006). Os rins e o fígado são considerados os órgãos de escolha para a identificação do agente, pois a partir de fragmentos desses órgãos será realizado o diagnóstico histopatológico e corados por técnicas de impregnação pela prata.

Para prevenir a leptospirose são sugeridas vacinas com composição específica baseada nos sorovares predominantes da região, mas que podem variar dependendo de cada região do país (Koizumi et al. 2013).

Este trabalho descreve um caso clínico de leptospirose canina com quadro agudo de insuficiência renal e hepática associado ao alto título de anticorpos contra o sorovar Canicola. O exame sorológico, a PCR e detecção de leptospiroses pela coloração por prata do fragmento de rim confirmaram o diagnóstico e o estado de leptospiúria e de portador renal característico desta espécie.

HISTÓRICO

Caso clínico

Foi levado ao Hospital Veterinário da Universidade de Londrina (HV - UEL), um cão macho, sem raça definida (SRD), com sete anos de idade que apresentava sinais clínicos de apatia, anorexia e vômitos há uma semana. A anamnese revelou além da êmese, a ocorrência de diarreia esverdeada há quatro dias evoluindo para emagrecimento progressivo, fraqueza muscular e oligodipsia.

Durante atendimento ambulatorial, foi coletada amostra de sangue para realização de exame de hemograma completo, bioquímica sérica e soroaglutinação microscópica para pesquisa de anticorpos contra leptospiroses; e amostra de urina para exame de urinálise e realização de pesquisa direta de espiroquetas em microscopia de campo escuro. O animal foi internado e durante esse período foram repetidos os exames de hemograma e bioquímica sérica no terceiro e quinto dia de internamento para acompanhamento da evolução do quadro clínico.

O paciente veio a óbito após oito dias e foi encaminhado ao laboratório de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) para realização da necropsia, na qual foram colhidas amostras de rim e fígado para a detecção do DNA da bactéria através das técnicas de PCR e *nested*-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa direta de espiroquetas na urina em microscopia de campo escuro

A amostra de urina foi coletada com sonda uretral e levada imediatamente ao laboratório de leptospirose do DMVP e uma gota foi analisada em microscópio utilizando-se objetivas de 20X, ocular de 15X e condensador de campo escuro.

Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos

Foi realizada a SAM segundo Faine et al., (1999) utilizando 22 sorovares mantidos vivos em cultura no laboratório, a diluição inicial foi de 1:100 e o resultado foi considerado positivo quando o antígeno aglutinado era igual ou maior a 50% ou se a densidade do antígeno

no livre era menor que 50% (quando comparados com o controle).

Urinálise

A amostra de urina foi coletada com sonda uretral e foi realizado o exame físico, químico e do sedimento no laboratório de patologia clínica do DMVP no primeiro, terceiro e quinto dia de internamento.

Bioquímica sérica

Para a verificação das funções hepáticas e renais foram analisados os níveis de ALT, FA, Uréia, Creatinina e Fósforo no laboratório de patologia clínica do DMVP no primeiro, terceiro e quinto dia de internamento.

Hemograma

Também no laboratório de patologia clínica do DMVP, foi realizado hemograma completo no primeiro, terceiro e quinto dia de internamento para analisar as séries branca e vermelha.

Exame macroscópico e microscópico

O animal foi submetido à necropsia padrão e fragmentos teciduais foram colhidos e fixados em solução de formalina a 10%. Os fragmentos foram processados de acordo com a rotina histológica e cortes de 5 µm de espessura foram submetidos à coloração de hematoxilina-eosina para análise histopatológica. A coloração de Warthin-Starry (WS) foi utilizada para identificação do agente em cortes histológicos de rim.

PCR e *nested*-PCR

As técnicas foram realizadas segundo Merien et al., (1992) no laboratório de virologia animal do DMVP utilizando os *primers* **A**, 5'-GGCGGCGGCTTAAACATG-3'; **B**, 5'-TTCCCCCAT TGAGCAAGATT-3'; **C**, 5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3'; e **D**, 5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3'. O produto da reação de *nested*-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (0,05µg/µL), e a visualização foi feita em transiluminador com luz ultravioleta.

RESULTADOS

No exame físico realizado durante o atendimento no HV observou-se normotermia, desidratação leve, depressão do nível de consciência, mucosas rosadas, secreção ocular purulenta, doença periodontal moderada e presença de carrapatos.

O hemograma não apresentou alteração (Tabela 1), a urinálise apresentou densidade de 1012 e alterações significativas como presença de proteínas, células epiteliais, leucócitos e hemácias (Tabela 2). Os exames bioquímicos revelaram azotemia, devido ao aumento da ureia e creatinina e hiperfosfate-mia (Tabela 3).

O animal foi internado e mantido na fluidoterapia 3x a manutenção com ringer lactato adiciona-

Tabela 1. Perfil hematológico do cão portador de leptospirose associada à Insuficiência Renal Aguda

Perfil	Dias			Valores de referência
	1	3	5	
Hemácias	7,83	7,45	6,98	5,5-8,5mm ³
Hemoglobina	15,5	14,4	13,6	12-18 g/dl
Hematócrito	47,4	45,1	44,1	37-55 %
VCM	60,6	60,6	63,3	60-77 F.L
CHCM	32,7	31,9	30,8	32-36 %
Leucócitos	15900	16300	14000	6000-17000
Segmentados	13356	14670	13020	3.000 a 11.500
Eosinófilos	318	-	-	100 a 1.250
Linfócitos	2067	1304	980	1.000 a 4.800
Monócitos	159	163	-	150 a 1.350

Tabela 2. Urinálise de cão portador de leptospirose associada à Insuficiência Renal Aguda

Exame físico		Exame químico		Exame do sedimento	
Volume	6mL	pH	6,0	Leucócitos	11/campo
Cor	Amarelo	Proteínas	+	Hemácias	10/campo
Aspecto	Límpido	Glicose	+	Bactérias	+
Densidade	1012				

Tabela 3. Perfil bioquímico do cão portador de leptospirose associada à Insuficiência Renal Aguda Exame da série bioquímica

Perfil	Dias			Valores de referência
	1	3	5	
Uréia	430	477	507	21,4-59,92 mg/dL
Creatinina	15,1	14,2	13,1	0,5-1,5 mg/dL
ALT	57	-	-	21-73 UI/L
FA	57	-	-	20-156 UI/L
Fósforo	17,8	17,8	17,9	2,6-6,2 mg/dL

dos de 20mL de glicose 50% e 3mL de KCl 19,1%; omeprazol 1mg/Kg uma vez ao dia, cerenia© (citrato de maropitant) 2mg/kg um comprimido ao dia, hidróxido de alumínio 12mL via oral duas vezes ao dia e ampicilina 22mg/Kg injetável três vezes ao dia. Durante os cinco primeiros dias o animal ainda teve episódios de vômitos e os exames mantiveram os mesmos valores.

O diagnóstico de infecção por *Leptospira* foi primeiro confirmado na SAM onde foram encontrados anticorpos com título de 51200 contra o sorovar Canicola. Na pesquisa direta de espiroquetas em microscopia de campo escuro não foram visualizadas estruturas com morfologia e movimentação compatíveis características das leptospiros na amostra de urina encaminhada ao laboratório no primeiro dia de internamento.

Ao exame macroscópico observou-se hepatomegalia acentuada, congestão hepática, rins com acentuado aumento de volume, aderência da cápsula renal ao parênquima, petéquias multifocais e irregularidade na superfície cortical renal. Ao corte evidenciou-se em ambos os rins infartos renais (5

e 2 cm de diâmetro no rim esquerdo e direito, respectivamente). No sistema digestório a mucosa do esôfago, estômago e intestino delgado apresentavam moderada hiperemia.

Ao exame microscópico observou-se nos rins infiltrado linfocitário multifocal acentuado no interstício e ocasionalmente neutrófilos. Áreas multifocais de calcificação e acentuada necrose tubular multifocal também foram observadas. A coloração de WS evidenciou estruturas alongadas, espiraladas (10µm) nas áreas de necrose e luz tubular (Figura 1). No fígado havia presença de vacúolos mal delimitados em hepatócitos e acentuada congestão vascular.

O resultado da reação de *nested*-PCR mostrou a amplificação de uma banda de 289pb (Figura 2) em ambas às amostras, de rim e de fígado, correspondente a amplificação do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S de *L. interrogans*.

DISCUSSÃO

A doença nos cães pode ocorrer na forma subclínica ou clínica, com evolução aguda ou crônica, e os sinais clínicos da leptospirose canina dependem de fatores como idade, status imunológico do hospedeiro e virulência do sorovar (Faine et al. 1999).

Segundo Greene et al. (2006), apesar da maioria das infecções causadas pela *Leptospira* ser de característica crônica ou subclínica, os animais podem apresentar insuficiência renal aguda. Neste cão os resultados dos exames foram compatíveis com quadro de insuficiência renal aguda, pois na fase de leptospirose as leptospiros albergadas nos túbulos renais podem causar alterações físico-químicas na urina (Nelson 2001).

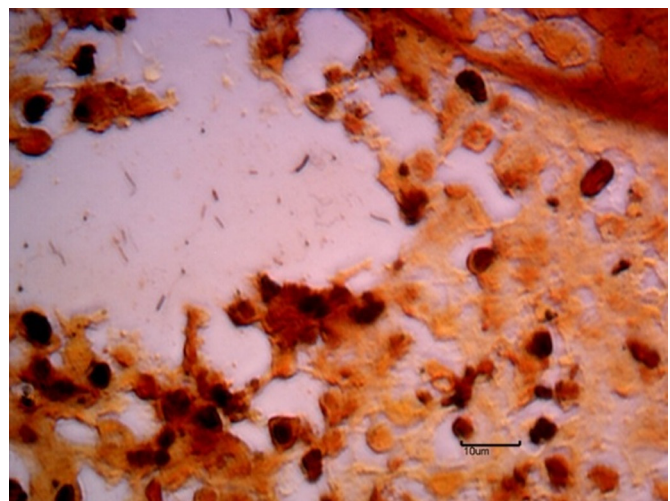


Figura 1. Fotomicrografia apresentando leptospiros nos túbulos renais de cão macho, sem raça definida (SRD). Coloração de Warthin-Starry, aumento (400X).

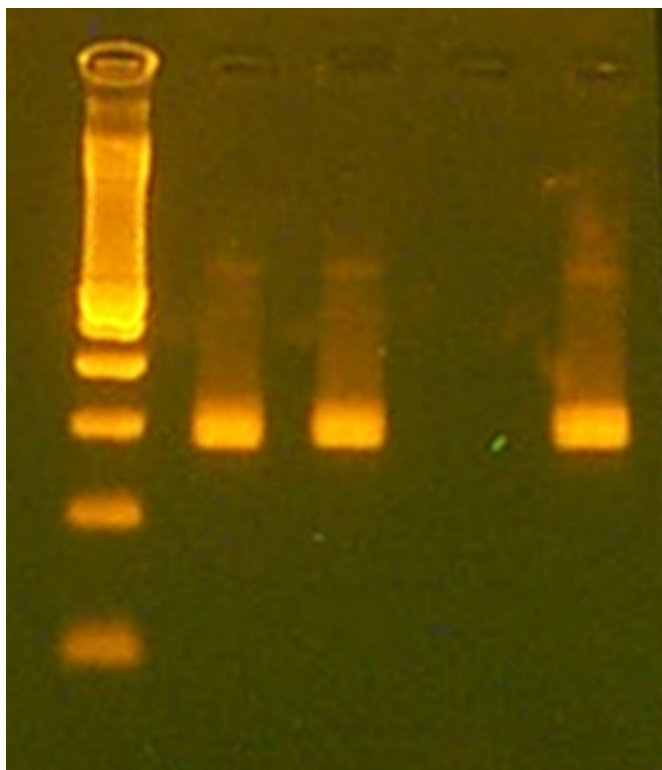


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo da nested-PCR para *Leptospira* spp. (289pb). Sequência das canaletas: 1- marcador de peso molecular 100pb, 2- amostra de fígado, 3- amostra de rim, 4- controle negativo, 5- controle positivo. Cão macho, sem raça definida (SRD).

Segundo Wohl (1996), uma forma urêmica geralmente acomete animais mais velhos, havendo febre, apatia, sono, inapetência, vômito e diarreia, sensibilidade renal, mucosas congestas, úlceras orais e de língua e o exame de urina mostra-se com graves alterações. Essa forma provoca nefrite intersticial aguda e leve insuficiência hepática, compatível com o quadro clínico do animal relatado.

Os exames laboratoriais como a visualização direta de leptospiros em microscópio de campo escuro é utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospiúria. Entretanto um resultado negativo para apenas uma mostra não é confiável, pois essa técnica apresenta como limitações a eliminação de forma intermitente da leptospira, lise pelo pH ácido da urina na espécie canina, baixa sensibilidade, e a necessidade de observador experiente (Goldstein 2010).

O alto título de anticorpos encontrado contra o sorovar *Canicola* indica que este é o mais provável causador da infecção confirmando que este sorovar pode causar mais lesões renais. Esse sorovar tem os cães urbanos como hospedeiros reservatórios que mantém a doença no meio ambiente, sendo fonte de infecção para outros cães e também para o homem (Brod et al. 2005). Segundo dados do laboratório de

leptospirose do DMVP/UEL, esse título alto de anticorpos encontrado neste cão não é o mais comum, pois os cães apresentam geralmente títulos baixos que são característicos da doença renal crônica de cães com leptospirose.

A colonização renal ocorre em cães mais infectados experimentalmente e a persistência e multiplicação das leptospiros nas células epiteliais tubulares renais causam a liberação de citocina, recrutamento de células inflamatórias, e conseqüentemente, nefrite aguda. Porém, não está evidente como esse processo pode desenvolver o estado de portador crônico com eliminação intermitente da bactéria pela urina (Goldstein 2010). No cão relatado neste estudo ficou evidente que a colonização renal pelo sorovar *Canicola* determinou as lesões nas células epitélio-tubulares e no interstício com conseqüente diminuição da perfusão renal resultando na insuficiência renal aguda. Ainda, as toxinas produzidas pela bactéria desencadearam a disfunção hepática e conseqüente degeneração observada neste caso. A literatura relata o quadro de hepatite ativa crônica (Freire et al. 2008) em cães com leptospirose, porém este animal não apresentava icterícia, confirmando que apenas animais infectados pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae* apresentam com mais frequência este sinal clínico (Geisen et al. 2007).

Segundo Hartskeerl & Terpstra (1996), cães que morrem devido à leptospirose aguda apresentam hemorragias disseminadas e necrose hepática focal e os rins apresentam lesões e, na forma aguda da doença, estão tumefeitos com presença de hemorragias equimóticas subcapsulares e corticais. Assim, os achados clínicos, laboratoriais, macroscópicos e microscópicos observados no presente caso indicam que o animal apresentava a forma aguda da doença, e apenas numa fase posterior, mais crônica, é que surgirão lesões como a diminuição do tamanho dos rins com a presença de aderências capsulares à superfície cortical e vários graus de fibrose cortical (Greene et al. 2006).

CONCLUSÃO

A análise dos dados da anamnese (epidemiológicos), associados aos achados clínicos e ao diagnóstico laboratorial ofereceram a confirmação da doença leptospirose no cão relatado. O comprometimento renal e hepático sugere a colonização desses órgãos, principalmente do rim. O título alto para o sorovar *Canicola* associado a grande quantidade de espiroquetas presente no rim é compatível com o achado clínico de azotemia e insuficiência renal aguda.

Agradecimentos. A Universidade Paranaense (UNIPAR) pelo financiamento concedido a esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Adler B. & de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140: 287-296, 2010.
- Batista C.S.A., Azevedo S.S., Alves C.J., Vasconcelos S.A., Morais M., Clementino I.J., Lima F.S. & Araujo Neto J.O. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, 41:131-136, 2004.
- Brod C.S., Aleixo J.A.G., Jouglard S.D.D., Fernandes C.P.H., Teixeira J.L.R. & Dellagostin O.A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38:294-300, 2005.
- Chetta M., Vicari D., Agnello S., Percipalle M., Ferrantelli V. & Vitale M. Canine Leptospirosis Cases and Molecular Screening for *Leptospira* interrogans Infection. *Pakistan Veterinary Journal*, 34:260-262, 2014.
- Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. MedSci, Melbourne, 1999.
- Freire I.M.A., Vargas R. & Lilenbaum W. Alterações na bioquímica hepática em cães com leptospirose aguda determinada por amostras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. *Ciência Rural*, 38:2630-2632, 2008.
- Geisen V., Stengel C., Brem S., Muller W., Greene C. & Hartmann K. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *Journal of Small Animal Practice*, 48:324-328, 2007.
- Goldstein R.E. Canine Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40:1091-1101, 2010.
- Greene C.E., Sykes J.E., Brown C.A. & Hartmann K. *Leptospirosis*, p.402-417. In: Greene C.E. (Ed.), *Infections Diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Saunders Elsevier, St Louis, 2006.
- Hartskeerl R.A. & Terpstra W.J. Leptospirosis in wild animals. *Veterinary Quarterly*, 18:149-150, 1996.
- Koizumi N., Muto M.M., Akachi S., Okano S., Yamamoto S., Horikawa K., Harada S., Funatsumaru S. & Ohnishi M. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs. *Japanese Journal of Microbiology*, 62:630-636, 2013.
- Levett P.N. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:296-326, 2001.
- Martins C.M., Barros C.C., Galindo C.M., Kikuti M., Ullmann L.S., Pampuch R.S., Hoffmann J.L., Langoni H., Ferreira F., Molento M.B. & Biondo A.W. Incidence of canine leptospirosis in the metropolitan area of Curitiba, State of Parana, Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46:772-775, 2013.
- Merien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G. & Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30:2219-2224, 1992.
- Nelson R.W. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 2^o ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001, p.1002-1003.
- Saleem M.H., Khan M.S., Khan M.A., Ijaz M., Hassan A. & Mehmood K. Serosurveillance of canine leptospirosis under different climatic conditions in and around Lahore, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, 33:241-243, 2013.
- Sykes J.E., Hartmann K., Lunn K.F., Moore G.E., Stoddard R.A. & Goldstein R.E. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: Diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25:1-13, 2011.
- Tangeman L.E & Littman M.P. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 Cases (2000-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243:1316-1322, 2013.
- Van De Maele I., Claus A., Haesebrouck F. & Daminet S. Leptospirosis in dogs: A review with emphasis on clinical aspects. *Veterinary Record*, 163:409-413, 2008.
- Wilson H., Bovens C. & Murphy K. Increase in canine leptospirosis cases. *Veterinary Record*, 176:235, 2015.
- Wohl J.S. Canine leptospirosis. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 18:1215-1241, 1996.
- Xu C., Loftis A., Ahluwalia S.K., Gao D., Verma A., Wang C. & Kaltenboeck B. Diagnosis of canine leptospirosis by a highly sensitive FRET-PCR targeting the lig genes. *PLoS One*, 9:e89507, 2014.
- Zhang Y., Bao L., Zhu H., Huang B. & Zhang H. OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42:70-79, 2009.