

Influencia de las estaciones climáticas en la presencia de leptospirosis canina en el norte y centro de Lima, Perú

Influence of climatic seasons in the presence of canine leptospirosis in northern and central Lima, Peru

Enrique Serrano-Martínez^{1,3}, César Burga C.¹, Elizabeth Hinostroza M.¹, Renato Zúñiga F.²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue identificar el comportamiento de la leptospirosis canina y su relación con las estaciones climáticas en la ciudad de Lima, Perú. Se diseñó un estudio retrospectivo analizando los resultados de sueros caninos que fueron evaluados con la prueba de microaglutinación (MAT) y su asociación con datos climáticos obtenidos del Sistema Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI) entre los años 2014 al 2017. Para el análisis de datos se utilizó un modelo lineal generalizado para evaluar la asociación entre los casos positivos a leptospirosis canina y las estaciones del año, junto al ajuste de factores de riesgo. La probabilidad de presentación de leptospirosis canina fue mayor en las estaciones de primavera-verano con respecto a la estación de otoño-invierno ($p < 0.05$). Los canes diagnosticados como positivos estuvieron expuestos a una mediana de temperatura ambiental de 20.6 °C y una mediana de humedad relativa de 83.1%. La edad, el sexo y el lugar de procedencia no mostraron asociación estadística con los casos positivos a *Leptospira* sp. Se concluye que las estaciones del año más calurosas (primavera-verano) en la ciudad de Lima están asociadas con la leptospirosis canina.

Palabras clave: leptospirosis, perros, clima, estaciones, Perú

¹ Grupo SANIVET, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ E-mail: enrique.serrano@upch.pe

Recibido: 16 de abril de 2019

Aceptado para publicación: 15 de marzo de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the behaviour of canine leptospirosis and its relationship with climatic seasons in the city of Lima, Peru. A retrospective study was designed analysing the results of canine sera that were evaluated with the micro-agglutination test (MAT) and its association with climatic data obtained from the National Meteorology and Hydrology System of Peru (SENAMHI) between 2014 and 2017. A generalized linear model was used to evaluate the association between positive cases to canine leptospirosis and the seasons, together with the adjustment of risk factors. The probability of presenting canine leptospirosis was higher in the spring-summer seasons compared to the autumn-winter season ($p < 0.05$). Dogs diagnosed as positive were exposed to an air temperature of 20.6 °C and a relative humidity of 83.1%. Age, sex and place of origin showed no statistical association with the positive cases of *Leptospira* sp. It is concluded that the hottest seasons of the year (spring-summer) in the city of Lima are associated with canine leptospirosis.

Key words: leptospirosis, dogs, weather, seasons, Peru

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica bacteriana de distribución mundial (Oliveira *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2016), animales silvestres y animales domésticos (Silva *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2016). *Leptospira interrogans* es la causante de la leptospirosis humana y animal (Fernandes *et al.*, 2016). Esta enfermedad está asociada a la ocurrencia de fiebre, ictericia, vómitos, diarrea, hemorragias, uremia causada por falla renal y, eventualmente, la muerte, aunque en la mayoría de los casos tienen presentación asintomática, tanto en humanos como en animales (Van de Maele *et al.*, 2008; Aygün *et al.*, 2016). Los roedores y caninos son los portadores más importantes de esta enfermedad (Rojas *et al.*, 2010; Guernier *et al.*, 2016), teniendo a los perros como los portadores más cercanos al hombre.

La transmisión de la enfermedad está influenciada por la presencia de portadores asintomáticos (roedores, cánidos, ganado) en regiones de climas húmedos tropicales y subtropicales. La infección ocurre por con-

tacto directo de las mucosas o lesiones de piel con orina, sangre, agua o tierras contaminadas con *Leptospira* spp (Villumsen *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2016; Kurilung *et al.*, 2017). En el caso de los cánidos, la infección desarrolla una leptospiremia con posterior invasión del tejido renal, excretando leptospiras por la orina por varios meses, contaminando el ambiente donde viven (Harkin *et al.*, 2003; Monahan *et al.*, 2008). Así mismo, los ambientes con altas temperaturas y humedad permiten la sobrevivencia de las leptospiras en la tierra y en cuerpos de agua durante meses (Trueba *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2013; Kurilung *et al.*, 2017), facilitando una mayor diseminación de la enfermedad (Bronson *et al.*, 2009).

En el Perú, los departamentos con mayores reportes de casos de leptospirosis confirmados en humanos son Loreto (21.6%), Cusco (14.8%), Madre de Dios (11.6%) y Lima (11.1%) (Céspedes *et al.*, 2006). Así mismo, se reporta el 27.8% de seroprevalencia de *Leptospira* en perros asintomáticos de la ciudad de Lima (Céspedes *et al.*, 2007) y 58% en perros clínicamente sospechosos (Siuze *et al.*, 2015), encontrándose

que las variables demográficas (edad, sexo, lugar de procedencia) influyen en la presentación de leptospirosis canina (Huerta *et al.*, 2013; Siuce *et al.*, 2015). No obstante, son escasos los estudios en la ciudad de Lima donde se evalúa la influencia de las condiciones climáticas en la frecuencia de la leptospirosis canina, a pesar de conocer su importancia en el proceso de transmisión (Lau *et al.*, 2010). Por ello, el objetivo del estudio fue evaluar la asociación de las estaciones del año con la presentación de casos positivos a *Leptospira* spp en canes con signos clínicos compatibles con leptospirosis en Lima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

Este estudio tuvo un diseño retrospectivo. Los datos fueron recabados del Laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), que recibe muestras de la Clínica Veterinaria Docente de la universidad, así como del laboratorio de análisis clínico «Vet Support» que recibe de canes remitidos de centros médicos veterinarios. Ambas instituciones se encuentran ubicadas en la zona de Lima Norte. Las muestras de sangre fueron analizadas mediante la prueba de microaglutinación (MAT), siguiendo el protocolo descrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú (Céspedes y Glenny, 2002) y con las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018). Los datos fueron tomados de los registros de canes sometidos a la prueba MAT, lo cual incluyó información básica como edad, sexo y lugar de procedencia.

Variables

Los perros con títulos mayores o iguales a 1:100 como resultado de la prueba de MAT fueron considerados como positivos a una infección por *Leptospira* spp (Céspedes y Glenny, 2002). Los canes vacunados o sin

conocimiento sobre su estado de vacunación se consideraron positivos si tuvieron títulos mayores o iguales a 1:400. Se utilizó este punto de corte teniendo en cuenta que los títulos vacunales no llegan a ser mayores a 1:400 y los títulos por infección por *Leptospira* spp alcanzan niveles que pueden superar los 1:1600 (Andre-Fontaine *et al.*, 2013).

La variable de exposición fue la estación del año categorizada en primavera-verano (entre el 22 de setiembre y el 19 de marzo) y otoño-invierno (entre el 20 de marzo y el 21 de setiembre). Se recolectaron, además, los registros de temperatura y humedad relativa atmosférica desde 2014 hasta marzo de 2017.

Se analizó la influencia de del sexo, edad, lugar de procedencia, año de infección, temperatura atmosférica (°C) y humedad relativa atmosférica (%) en la presentación de leptospirosis canina.

Análisis de Datos

Las características de la población se describieron como medianas con valores mínimos y máximos para variables cuantitativas y como frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas. Se describió la asociación de la leptospirosis canina con los factores de riesgo a través de un análisis bivariado con la prueba de Chi cuadrado para variables categóricas y la prueba U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Finalmente se usó un modelo lineal generalizado de la familia Poisson con función de enlace log y errores estándares robustos para evaluar la razón de prevalencia de leptospirosis canina entre las estaciones del año ajustado por las covariables edad, sexo, lugar de procedencia y año de infección. Se evaluó el mejor modelo lineal usando el criterio de información bayesiana (BIC) y la colinealidad entre variables independientes fue evaluado con el factor de inflación de la varianza (VIF). Todos los análisis estadísticos fueron ejecutados con el software Stata 14.

RESULTADOS

La ciudad de Lima mostró una mediana de temperatura atmosférica de 19.3 °C y una humedad relativa de 83.3% entre 2014 y 2017 (Cuadro 1). Se evaluaron los registros de 271 canes cuyas muestras fueron tomadas en esos años. La prevalencia de leptospirosis canina en perros clínicamente sospechosos fue de 34% (IC_{95%}: 28.7 ± 40.3). La mayor parte de los casos se presentaron en perros machos (61%) entre 1 y 6 años de vida (47.9%), provenientes de Lima norte (83.9%).

La mayor frecuencia de casos se encontró en las estaciones de primavera-verano (44.7%) con relación otoño-invierno (24.5%) ($p=0.001$). Los canes diagnosticados como positivos estuvieron expuestos a una mediana de temperatura ambiental de 20.6 °C y una mediana de humedad relativa de 83.1%. Ambos parámetros climáticos mostraron diferencias significativas ($p=0.001$) en las estaciones de primavera-verano y otoño-invierno. Así mismo, 2016 y 2017 presentaron la mayor frecuencia de casos ($p<0.05$), mientras que la edad, el sexo y el lugar de procedencia no mostraron asociación estadística (Cuadro 2).

Los resultados obtenidos en el análisis multivariado muestran que las estaciones de primavera-verano tienen mayor probabilidad de presentar casos de leptospirosis canina (RP: 1.82; IC_{95%} 1.28-2.59). La fuerza de asociación se mantiene al ajustar por edad, sexo y lugar de procedencia. Las variables temperatura atmosférica y humedad relativa no se analizaron por problemas de colinealidad con las estaciones del año. La edad, el sexo, lugar de procedencia y año de infección se incluyeron en el modelo y al igual que en el análisis bivariado no mostraron asociación estadísticamente significativa, a diferencia de la variable año de infección ($p<0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 1. Características de la muestra de canes sospechosos de *Leptospira* sp y variables climáticas en la ciudad de Lima Norte y Centro entre 2014 y 2017

Características	n (%)
Sexo	
Hembra	104 (38.4)
Macho	167 (61.6)
Edad (años)	
0-1	42 (16.0)
>1-6	126 (47.9)
>6	95 (36.1)
Procedencia	
Lima norte	219 (83.9)
Lima centro	42 (16.1)
Año	
2014	54 (19.9)
2015	90 (33.2)
2016	101 (37.3)
2017	26 (9.3)
Estaciones del Año	
Primavera-verano	132 (48.7)
Otoño-invierno	139 (52.3)
<i>Leptospira</i> spp	
Positivos	93 (34.3)
Negativos	178 (65.7)
Temperatura atmosférica (°C) ¹	19.3 (15.6 - 25.0)
Humedad relativa atmosférica (%) ¹	83.3 (74.9 - 88.2)

¹ Mediana (valor mínimo y máximo)

DISCUSIÓN

Se encontró una mayor frecuencia de leptospirosis en las estaciones de primavera-verano con respecto a las de otoño-invierno, sugiriendo que altos niveles de humedad y

Cuadro 2. Factores asociados a la presencia de *Leptospira* spp en canes clínicamente sospechosos de leptospirosis en Lima Norte y Centro entre 2014 y 2017

Variables	Presencia de <i>Leptospira</i> spp		X ² Pearson Valor p
	Positivos (n=93) n (%)	Negativos (n=178) n (%)	
Sexo			
Hembra	37 (35.6)	67 (64.4)	0.73
Macho	56 (33.5)	111 (66.5)	
Edad (años)			
0-1	12 (28.6)	30 (71.4)	0.498
>1-6	44 (34.9)	82 (65.1)	
>6	37 (38.9)	58 (61.1)	
Procedencia			
Lima norte	72 (32.9)	147 (67.1)	0.341
Lima centro	17 (40.5)	25 (59.5)	
Año			
2014	9 (16.7)	45 (83.3)	< 0.001
2015	12 (21.1)	71 (78.9)	
2016	47 (46.5)	54 (53.5)	
2017	18 (69.3)	8 (30.7)	
Estaciones del Año			
Primavera-verano	59 (44.7)	73 (55.3)	0.001
Otoño-invierno	34 (24.5)	105 (75.5)	
Temperatura atmosférica (°C) ¹	20.6 (16.32-25.0)	18.8 (15.6-25.0)	0.001 ²
Humedad relativa atmosférica (%) ¹	81.5 (74.9 - 87.4)	83.4 (76.0 - 88.2)	0.002 ²

¹ Mediana (valor mínimo y máximo)

² Valor p obtenido por la prueba U de Mann-Whitney

calor en la atmosfera influyen en la presencia de la enfermedad. Además, en la mayor época de calor ocurre la mayor reproducción de los portadores (Bronson *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2013; Kurilung *et al.*, 2017). Así mismo, Huerta *et al.* (2013) encontró una mayor, aunque no significativa, frecuencia de

leptospirosis canina en el verano de Lima de los años 2002-2007, posiblemente debido a la pequeña variabilidad climática existente.

Muchos de los factores de riesgo evaluados en este trabajo no mostraron diferencia estadística. La variable edad no mostró

Cuadro 3. Factores asociados a la frecuencia de leptospirosis canina en un análisis de regresión múltiple en la ciudad de Lima del 2014 al 2017

Variables	Análisis bivariado ¹			Regresión múltiple ajustada ²		
	RP*	IC 95%	p	RP	IC 95%	p
Sexo						
Hembra	Ref.	-		Ref.	-	
Macho	0.94	0.67-1.31	0.730	1.02	0.71-1.40	0.896
Edad (años)						
0-1	Ref.	-		Ref.	-	
>1-6	1.22	0.72-2.09	0.463	1.09	0.67-1.78	0.716
>6	1.36	0.79-2.34	0.262	1.21	0.72-2.03	0.466
Procedencia						
Lima norte	Ref.	-		Ref.	-	
Lima centro	1.23	0.81-1.86	0.324	1.18	0.81-1.73	0.383
Año						
2014	Ref.	-		Ref.	-	
2015	1.27	0.62-2.59	0.519	1.25	0.61-2.58	0.547
2016	2.79	1.48-5.26	0.001	2.62	1.39-4.29	0.003
2017	4.15	2.16-7.95	0.001	3.11	1.61-6.03	0.001
Estaciones del Año						
Otoño-invierno	Ref.	-		Ref.	-	
Primavera-verano	1.83	1.29-2.59	0.001	1.82	1.28-2.59	0.001

¹ Razón de prevalencias

² Modelo ajustado por sexo, edad, lugar de procedencia

una diferencia estadística en comparación de otros estudios donde se observa que canes mayores a 1 año presentan una mayor frecuencia de leptospirosis (Rubel *et al.*, 1997; Batista *et al.*, 2005; Huerta *et al.*, 2013; Siuce *et al.*, 2015). El sexo tampoco mostró una diferencia estadística, tal y como lo reportan Batista *et al.* (2005) y Silva *et al.* (2007), aunque se dispone de estudios que demuestran al macho como factor de riesgo (Huerta *et al.*, 2013; Siuce *et al.*, 2015).

La procedencia de los canes no muestra una influencia en la presencia de leptospirosis. La falta de asociación estaría explicada por las amplias similitudes socioculturales y climáticas entre los distritos de Lima norte y centro. Por otro lado, el efecto de año (2016 y 2017) observado en el presente estudio se puede asociar a los cambios climáticos debido al efecto invernadero que genera un incremento de la temperatura año tras año (Frumkin *et al.*, 2008; Lau *et al.*,

2010), siendo de 0.5 °C por año en los registros del presente estudio. Adicionalmente, en el verano de 2017 se registró el fenómeno de «El Niño» que afectó a la ciudad de Lima, existiendo evidencias de asociación de la leptospirosis con este fenómeno climático (Storck *et al.*, 2008).

No obstante, este trabajo tiene limitaciones que pueden ser tomadas en cuenta al evaluar los hallazgos, pues la población de estudio incluyó solo a perros clínicamente sospechosos de leptospirosis que fueron llevados por sus dueños a una clínica veterinaria. Sin embargo, la condición climática de cada estación del año afecta a toda la población canina de manera indistinta.

El punto de corte en la prueba de MAT para la definición de enfermo fue otra limitación que puede afectar los resultados. La falta de antecedentes de vacunación en los perros de este estudio no permitió saber con certeza si los títulos de anticuerpos menores a 1:400 se deben a anticuerpos vacunales o por infección de *Leptospira* spp en fase clínica inicial (Andre-Fontaine *et al.*, 2013; Picardeau, 2013), lo cual podría estar subestimando la prevalencia.

CONCLUSIÓN

Las estaciones más calurosas (primavera-verano) favorecen el aumento en la frecuencia de leptospirosis canina en la ciudad de Lima, Perú.

LITERATURA CITADA

1. **Andre-Fontaine G. 2013.** Diagnosis algorithm for leptospirosis in dogs: disease and vaccination effects on the serological results. *Vet Rec* 172: 502. doi: 10.1136/vr.101333
2. **Aygün FD, Avar-Aydın PÖ, Çokugras H, Camcioglu Y. 2016.** Different clinical spectrum of leptospirosis. *Turk J Pediatr* 58: 212-215. doi: 10.24953/turkjped.-2016.02.015
3. **Batista CSA, Alves CJ, Azevedo SS, Vasconcellos SA, Morais ZM, Clementino IJ, et al. 2005.** Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in dogs from Campina Grande, State of Paraíba, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57(Suppl 2): 179-185. doi: 10.1590/S0102-09352005000800008
4. **Bronson FH. 2009.** Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 3331-3340. doi: 10.1098/rstb.2009.0140
5. **Céspedes M, Glennly M. 2002.** Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Serie de Normas Técnicas 34. [Internet]. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1049_INS-NT34.pdf
6. **Céspedes M, Balda L, González D, Tapia R. 2006.** Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 23: 56-66.
7. **Céspedes M, Chun M, Cano E, Huaranca I, Atoche H, Ortiz H, Valentín M, et al. 2007.** Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en personas asintomáticos y en perros de Chancay, Lima 2001. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 24: 343-349.
8. **Fernandes LG, Siqueira GH, Teixeira ARF, Silva LP, Figueredo JM, Cosate MR, et al. 2016.** *Leptospira* spp: novel insights into host-pathogen interactions. *Vet Immunol Immunopathol* 176: 50-57. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.12.004
9. **Frumkin H, Hess J, Lubner G, Malilay J, McGehee M. 2008.** Climate change: the public health response. *Am J Public Health* 98: 435-445.
10. **Guernier V, Lagadec E, Cordonin C, Le Minter G, Gomard Y, Pagés S, Jaffar-Bandjee, et al. 2016.** Human leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: are rodents the (only) ones to blame? *PLoS Negl Trop Dis* 10(6): e0004733. doi: 10.1371/journal.pntd.0004733

11. **Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. 2005.** Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222: 1230-1233. doi: 10.2460/javma.2003.222.1230
12. **Huerta C, Chilón V, Díaz D. 2013.** Case-control study of risk factors for canine leptospirosis in Lima. *Rev Inv Vet Perú* 24: 111-117.
13. **Siuce J, Calle S, Pinto C, Pacheco G, Salvatierra G. 2015.** Identificación de serogrupos patógenos de *Leptospira* en canes domésticos. *Rev Inv Vet Perú* 26: 664-675. doi: 10.15381/rivep.v26i4.11221
14. **Kurilung A, Chanchaithong P, Lugsomya K, Niyomtham W, Wuthiekanun V, Prapasarakul N. 2017.** Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Res Vet Sci* 115: 146-154. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.03.017
15. **Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. 2010.** Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 631-638. doi: 10.1016/j.trstmh.-2010.07.002
16. **Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. 2008.** Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infec Immun* 76: 4952-4858. doi: 10.1128/IAI.00511-08
17. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2018.** Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Leptospirosis. Paris. [Internet]. Disponible en: <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/>
18. **Picardeau M. 2013.** Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect* 43: 1-9. doi: 10.1016/j.medmal.-2012.11.005
19. **Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. 2010.** Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 1305-1309. doi: 10.1007/s10096-010-0991-2
20. **Rubel D, Seijo A, Cernigoi B, Viale A, Wisnivesky C. 1997.** *Leptospira interrogans* in a canine population of Greater Buenos Aires: variables associated with seropositivity. *Rev Panam Salud Pública* 2: 102-105.
21. **Saito M, Villanueva SYAM, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, Asoh T, et al. 2013.** Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol* 79: 601-609. doi: 10.1128/AEM.02728-12
22. **Silva S, José R, Gírio S, Neto GG. 2010.** Anticorpos anti-*Leptospira* spp em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 47: 237-242.
23. **Silva RF, Riedemann S. 2007.** Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch Med Vet* 39: 269-274. doi: 10.4067/S0301-732X2007000300011
24. **Storck CH, Postic D, Lamaury I, Perez JM. 2008.** Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003-2004, a two El Niño southern oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol Infect* 136: 1407-1415. doi: 10.1017/S0950268807000052
25. **Tan WL, Soelar SA, Mohd Suan MA, Hussin N, Cheah WK, Verasahib K, et al. 2016.** Leptospirosis incidence and mortality in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 47: 434-440.

26. **Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. 2004.** Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7: 35-40.
27. **Van de Maele I, Claus A, Haesebrouck F, Daminet S. 2008.** Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec* 163: 409-413. doi: 10.1136/vr.163.14.409
28. **Vieira AS, Narduche L, Martins G, Schabib Péres IA, Zimmermann NP, Juliano RS, et al. 2016.** Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. *Acta Trop* 163: 87-89. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.08.001
29. **Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Kroghfelt KA. 2012.** Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods* 91: 184-190. doi: 10.1016/j.mimet.2012.06.009