

## Pengesanan dan Pencirian *Leptospira* spp. pada Haiwan Liar dan Persekitaran di Pusat Pemuliharaan *ex situ*

(Detection and Characterization of *Leptospira* spp. in Wildlife and the Environment at the *ex situ* Conservation Centre)

NADIA AQILLA SHAMSUSAH, BADRUL MUNIR MD ZAIN, SABAPATHY DHARMALINGAM, FAIRUZ AMRAN & HANI-KARTINI AGUSTAR\*

### ABSTRAK

*Leptospirosis* ialah penyakit berjangkit yang disebabkan oleh bakteria *Leptospira* yang boleh menjangkiti manusia dan haiwan. Kajian ini dijalankan bagi mengenal pasti jangkitan leptospirosis yang berkisar antara orang utan, rodent dan persekitaran di Pulau Orang Utan Bukit Merah (BMOUI) dan Zoo Taiping, Perak. Sampel haiwan serta persekitaran yang diperolehi dari kedua-dua kawasan kajian diinokulasi dalam media Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) untuk pengkulturan *Leptospira*. Pengesanan dan pencirian mudah spesies *Leptospira* melalui PCR dilakukan ke atas kultur serta sampel haiwan yang positif. Pencirian spesies yang lebih mendalam sehingga peringkat serovar menggunakan penjenisan jujukan multi-lokus (MLST) hanya dilakukan ke atas kultur patogenik sahaja. Sebanyak 8/14 kultur daripada sampel persekitaran BMOUI merupakan spesies saprofitik (*L. yanagawae*, *L. meyeri* dan *L. idonii*), 4/14 adalah spesies perantaraan (*L. wolffii*) dan 2/14 (dilabel sebagai 'Soil2' dan 'BJ3 soil') adalah spesies patogenik. Hasil MLST menunjukkan kultur 'Soil2' telah dikenal pasti sebagai *L. interrogans* serovar Lai Langkawi dengan nilai penjenisan jujukan, ST: 236. 'BJ3 soil' pula telah diberikan profil alel baharu yang menjana nilai ST baharu iaitu 262 di bawah spesies *L. kmetyi*. Kesemua 15/15 kultur daripada sampel persekitaran Zoo Taiping merupakan spesies saprofit (*L. yanagawae* dan *L. meyeri*). *Leptospira* yang dikesan secara langsung dalam sampel orang utan dan tikus dari BMOUI berkait rapat dengan spesies *L. wolffii*. Sampel orang utan dari Zoo Taiping pula berkait rapat dengan spesies *L. kmetyi* dan *L. wolffii*. Kajian ini berjaya membuktikan bahawa berlakunya transmisi leptospirosis di BMOUI dan Zoo Taiping yang sememangnya amat penting dalam menambahbaik strategi pencegahan penyakit ini sekaligus membantu dalam usaha pemuliharaan orang utan.

Kata kunci: *Leptospira*; leptospirosis; orang utan; pencirian; rodent

### ABSTRACT

*Leptospirosis* is a bacterial disease caused by *Leptospira* that infects human and animals. This study was carried out to determine the presence of *Leptospira* that circulates among orang utans, rodents, and environment in Bukit Merah Orang Utan Island (BMOUI) and Taiping Zoo, Perak. Animal and environmental samples obtained from both study sites were inoculated into Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) media for leptospiral culturing. Simple detection and characterization of leptospiral species through PCR were conducted on positive cultures and animal samples. Further characterization of leptospiral species up to serovar level via multi-locus sequence typing (MLST) was conducted on pathogenic cultures only. 8/14 isolates from BMOUI environmental samples were known as saprophytic species (*L. yanagawae*, *L. meyeri* and *L. idonii*), 4/14 as intermediate species (*L. wolffii*) and 2/14 (labelled as 'Soil2' and 'BJ3 soil') as pathogenic leptospire. Through MLST, 'Soil2' was characterized as *L. interrogans* serovar Lai Langkawi with sequence typing, ST number: 236. Isolate 'BJ3 soil' was given a new set of allelic profiles and ST number of 262 (*L. kmetyi*). 15/15 environmental cultures from Taiping Zoo were identified as *L. yanagawae* and *L. meyeri*. *Leptospira* in orang utan and rodent samples from BMOUI have shown to be closely related to *L. wolffii*. Strains detected in orang utan samples from Taiping Zoo were closely related to *L. kmetyi* and *L. wolffii*. This study provides evidence on leptospirosis transmission in both locations which can be important for improving strategies in prevention of the disease thus helping in conservation of the orang utans.

Keywords: Characterization; *Leptospira*; leptospirosis; orang utans; rodents

## PENGENALAN

Leptospirosis ialah sejenis penyakit zoonotik yang disebabkan oleh bakteria heliks daripada genus *Leptospira* (Dietrich et al. 2015). Penyakit ini dipercayai telah merebak ke seluruh dunia khususnya di kawasan tropika dan subtropika (Bharti et al. 2003; Dechner 2013; LaRocque et al. 2005; Levett 2001; Slack et al. 2006). Jangkitan *Leptospira* boleh dikelaskan kepada tiga iaitu asimptomatik (tanpa gejala), sederhana dan teruk. Walaupun jangkitan *Leptospira* dipercayai kurang merbahaya kepada perumah takungan, namun apabila serovar (antigen khusus yang terdapat pada *Leptospira* spp.) tidak dapat beradaptasi dengan perumah yang dijangkiti, hal ini akan menyebabkan jangkitan yang lebih serius. Gejala penyakit juga adalah berbeza bergantung pada spesies haiwan yang dijangkiti. Namun, antara gejala umum yang sering dihidapi adalah penyakit ginjal, hati serta kegagalan sistem pembiakan. Bagi manusia yang dijangkiti, antara manifestasi klinikal yang dapat dilihat adalah jaundis, anoreksia, sakit kepala, muntah-muntah, batuk, sakit perut, cirit-birit serta kegagalan buah pinggang (Vijayachari et al. 2008). Transmisi leptospirosis boleh dibahagikan kepada dua iaitu sama ada secara langsung ataupun tidak langsung. Transmisi secara langsung berlaku antara perumah melalui gigitan dan luka yang terdedah di samping sentuhan secara langsung terhadap air kencing atau membran bermukus perumah yang dijangkiti. Transmisi tidak langsung pula berlaku apabila manusia atau haiwan terminum air yang telah dicemari dengan bakteria *Leptospira* (Dechner 2013; Famatiga 1973).

Leptospirosis telah kembali muncul sebagai penyakit berjangkit yang utama di Malaysia memandangkan berlakunya peningkatan kes jangkitan dan kematian khususnya di sekitar kawasan rekreasi dan rezab hidupan liar (Arif 2013). Sehubungan itu, haiwan liar seperti primat bukan manusia telah dikenali sebagai salah satu perumah *Leptospira* kerana haiwan ini boleh mendapat jangkitan daripada perumah lain yang berhampiran khususnya tikus (Bengis et al. 2004; Cantu et al. 2008; Kilbourn et al. 2003; Pavlin et al. 2009). Contohnya, monyet probosis dan lutung di Taman Negara Bako, Sarawak telah mendapat jangkitan *Leptospira* secara langsung melalui tikus dan juga secara tidak langsung melalui air sungai (Jalil 2009). Kajian lepas oleh Thayaparan et al. (2014) juga telah menunjukkan jangkitan leptospirosis dengan bacaan titer yang tinggi ( $\geq 1:400$ ) terhadap kera di Pusat Hidupan Liar Matang, Sarawak. Walau bagaimanapun, tiada data epidemiologi leptospirosis dalam primat liar khususnya orang utan di bahagian Semenanjung Malaysia, sekaligus peranan mereka sebagai perumah *Leptospira* kurang diketahui. Oleh itu, kajian ini dijalankan bagi mengenal pasti jangkitan leptospirosis yang berkisar antara orang utan, rodent dan persekitaran di BMOUI dan Zoo Taiping, Perak.

## BAHAN DAN KAEDAH

### KAWASAN KAJIAN

Kajian ini dijalankan di BMOUI dan Zoo Taiping, Perak kerana kedua-dua kawasan ini merupakan pusat konservasi orang utan di Semenanjung Malaysia. Pensampelan dilakukan sebanyak empat kali bermula dari bulan April 2017 sehingga Januari 2018.

### SAMPEL KAJIAN

Sebanyak 30 perangkap rodent bersaiz  $30 \times 20 \times 20$  cm dipasang secara rawak di sekitar kawasan orang utan di BMOUI dan Zoo Taiping. Rodent yang berjaya ditangkap dimatikan menggunakan cecair 30% v/v isofluran dalam propilena glikol sebelum pembedahan dilakukan. Pengenalpastian spesies rodent adalah berdasarkan Francis and Barret (2008) yang merujuk kepada beberapa ciri fenotip seperti warna bulu di bahagian sisi, ventral dan dorsal badan, telinga, ekor, kaki belakang serta ukuran panjang dan berat. Sampel darah diambil melalui cucukan jantung dan air kencing (jika ada) diperolehi daripada pundi kencing. Organ dalaman seperti ginjal, limpa dan hati rodent juga diambil. Bagi orang utan pula, sampel air kencing diperolehi daripada takungan atas lantai kurungan masing-masing menggunakan picagari dan disimpan ke dalam tiub Falcon 15 mL yang berlabel. Pensampelan tanah lembap dan air diambil secara rawak di sekitar sangkar dan laluan orang utan menggunakan tiub Falcon 50 mL berlabel.

Semua sampel haiwan dan persekitaran yang diambil dibawa ke makmal untuk diproses dalam tempoh 12 jam bagi pemencilan *Leptospira* ke dalam media EMJH. Kesemua kultur dieram secara aerobik dalam inkubator pada suhu 28-30 °C dan diperiksa di bawah mikroskopi medan gelap dengan selang masa tujuh hari untuk tempoh tiga bulan bagi mengenal pasti kehadiran *Leptospira* (Benacer et al. 2013). Lebihan sampel air kencing dan organ dalaman haiwan kemudiannya disimpan dalam suhu -20 °C untuk ujian molekul selanjutnya.

### PENGEKSTRAKAN DNA

Sampel organ dan air kencing haiwan diekstrak menggunakan QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) berdasarkan arahan pengeluar. Sampel kultur positif *Leptospira* pula diekstrak menggunakan kaedah pendidihan. Dalam kaedah ini, sebanyak 2 mL sampel kultur dipelet dengan kelajuan 13 000 rcf selama 30 min pada suhu 4 °C, dicuci dua kali dengan 1 mL PBS dan diampai semula dalam 150  $\mu$ L penimbal Tris-EDTA (TE) sebelum dididih pada suhu 100 °C selama tujuh min. Kuantifikasi DNA oleh Thermo Scientific™ NanoDrop™ spektrofotometer kemudiannya dilakukan bagi menganggarkan kepekatan DNA dengan lebih

tepat. Setiap sampel DNA yang telah diekstrak disimpan pada suhu -20 °C bagi mengelakkan berlakunya proses degradasi (Baust 2008).

#### PENGESANAN DAN PENCIRIAN *Leptospira* spp. DALAM KULTUR POSITIF

Selain pemerhatian morfologi, pengesanan genus *Leptospira* daripada bakteria yang dikultur melalui kaedah molekul juga dilakukan. Primer gen 16S *rRNA* (F: GGCGGCGCGTCTTAAACATG, R: GTCCGCCTACGCACCCTTACG) digunakan dalam PCR kerana kebolehan primer ini dalam mengesan semua jenis *Leptospira* sama ada spesies patogenik mahupun saprofitik (Djadjid et al. 2009). Tindak balas PCR dilakukan dalam jumlah isi padu 25 µL yang mengandungi 1× penimbal PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer, 0.05 U Taq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) dan 40-60 ng templat DNA. Profil kitaran PCR terdiri daripada pra-denaturasi pada suhu 94 °C selama 3 min, 35 kitaran untuk suhu 94 °C (1 min) (denaturasi), 54 °C (1 min) (penyepuhan), 72 °C (2 min) (pemanjangan) serta paca-pemanjangan pada suhu 72 °C selama 10 min. Semua produk PCR dianalisis melalui elektroforesis gel agaros berkepekatan 1.5%. Saiz hasil produk teramplifikasi dianggar dengan membandingkan jalur DNA dengan jalur penanda tetangga 100 pb (1st BASE Biochemicals). Produk DNA yang teramplifikasi daripada primer 16S *rRNA* dihantar ke Syarikat 1st BASE Sdn Bhd., Malaysia untuk penjujukan DNA. Hasil penjujukan DNA kemudiannya dijajarkan menggunakan perisian Molecular Evolutionary Genetic Analysis Versi 7 (MEGA 7) melalui Muscle sebelum dibandingkan dengan pangkalan data GenBank menggunakan algoritma BLAST yang boleh didapati di laman web <http://www.ncbi.nih.gov>.

Pencirian jujukan multi-lokus hanya dilakukan ke atas penciran patogenik bagi mencari *Leptospira* berdasarkan skema yang menyasarkan tujuh lokus (*glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* dan *caiB*) daripada tujuh spesies *Leptospira* patogenik (*L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* dan *L. weilii*) (Boonsilp et al. 2013). Tindak balas PCR dilakukan dalam jumlah isi padu 25 µL yang mengandungi 1× penimbal PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer, 0.05 U Taq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) dan 40-60 ng templat DNA. Profil kitaran PCR terdiri daripada pra-denaturasi pada suhu 94 °C selama 3 min, 35 kitaran untuk suhu 94 °C (1 min) (denaturasi), 49.2-56.8 °C (1 min) (penyepuhan), 72 °C (2 min) (pemanjangan) serta paca-pemanjangan pada suhu 72 °C selama 10 min. Semua produk PCR dianalisis melalui elektroforesis gel agaros berkepekatan 1.5% dan

hasil yang teramplifikasi daripada ketujuh-tujuh primer dihantar ke syarikat 1st BASE Sdn Bhd., Malaysia untuk penjujukan DNA. Hasil penjujukan DNA kemudiannya dipotong dan dijajarkan bersama jujukan rujukan yang diperoleh daripada pangkalan data pubMLST (<https://pubmlst.org/leptospira/>) menggunakan perisian MEGA 7 melalui Muscle. Jujukan yang telah dijajarkan ini dibandingkan dengan pangkalan data pubMLST untuk mendapatkan tujuh profil alel (*glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* dan *caiB*). Gabungan tujuh profil alel ini menghasilkan nilai ST yang kemudiannya dibandingkan dengan pangkalan data pubMLST untuk pencirian *Leptospira* spp.

#### PENGESANAN DAN PENCIRIAN *Leptospira* spp. DALAM SAMPEL HAIWAN (KULTUR NEGATIF)

Bagi mengesan dan mencari *Leptospira* dalam sampel haiwan, primer gen *rrs2* (F-CATGCAAGTCAAGCGGAGTA, R-GCATCGAGAGGAATTAACATCA) (Ahmed et al. 2006) digunakan. Tindak balas PCR dilakukan dalam jumlah isi padu 25 µL yang mengandungi 1× penimbal PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer, 0.05 U Taq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) dan 40-60 ng templat DNA. Profil kitaran PCR terdiri daripada pra-denaturasi pada suhu 94 °C selama 3 min, 35 kitaran untuk suhu 94 °C (1 min) (denaturasi), 54 °C (1 min) (penyepuhan), 72 °C (2 min) (pemanjangan) serta paca-pemanjangan pada suhu 72 °C selama 10 min. Semua produk PCR dianalisis melalui elektroforesis gel agaros berkepekatan 1.5% dan hasil yang teramplifikasi daripada primer *rrs2* dihantar ke Syarikat 1st BASE, Sdn Bhd., Malaysia untuk penjujukan DNA. Hasil penjujukan DNA kemudiannya dijajarkan menggunakan perisian MEGA 7 melalui Muscle sebelum dibandingkan dengan pangkalan data GenBank menggunakan algoritma BLAST.

#### ANALISIS DATA DAN STATISTIK

Pohon filogeni berdasarkan kaedah hubungan jiran dengan butstrap 1000 dibangunkan berdasarkan semua jujukan sampel yang telah dijajarkan bersama jujukan rujukan melalui Clustal W menggunakan perisian MEGA 7.

#### ETIKA KAJIAN

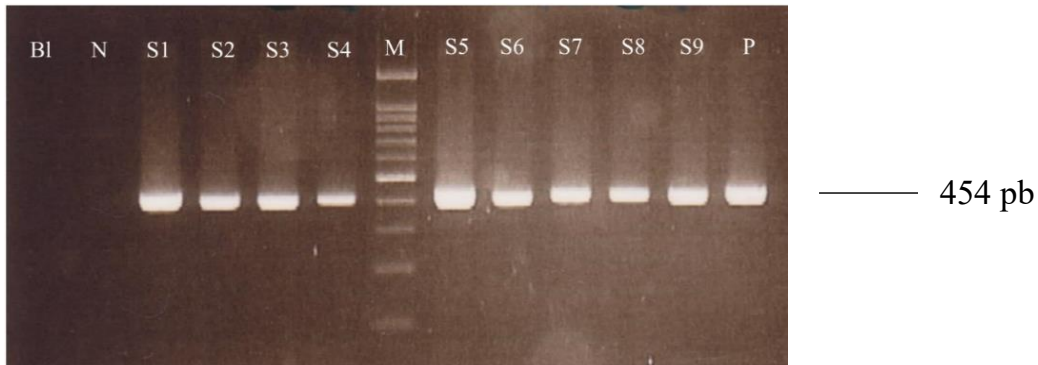
Kajian ini telah diluluskan oleh Jabatan PERHILITAN dengan permit khas: B-00245-16-17, Jawatankuasa Etika Haiwan UKM (UKMAEC): FST/2016/HANI/25-JAN./822-JAN.-2017-JUNE-2018 dan Jawatankuasa Etika Manusia UKM: UKM/PPI/111/8/JEP-2017-243.

## HASIL DAN PERBINCANGAN

PENGESANAN DAN PENCIRIAN *Leptospira* spp. DALAM KULTUR POSITIF MELALUI GEN 16S *rRNA*

Sebanyak 14/87 kultur *Leptospira* yang dipencilkan

daripada sampel tanah BMOUI serta 8/36 kultur daripada sampel tanah Zoo Taiping dan 7/37 kultur daripada sampel air Zoo Taiping telah berjaya mengamplifikasi gen 16S *rRNA* dengan saiz jalur 454 pb (Rajah 1).



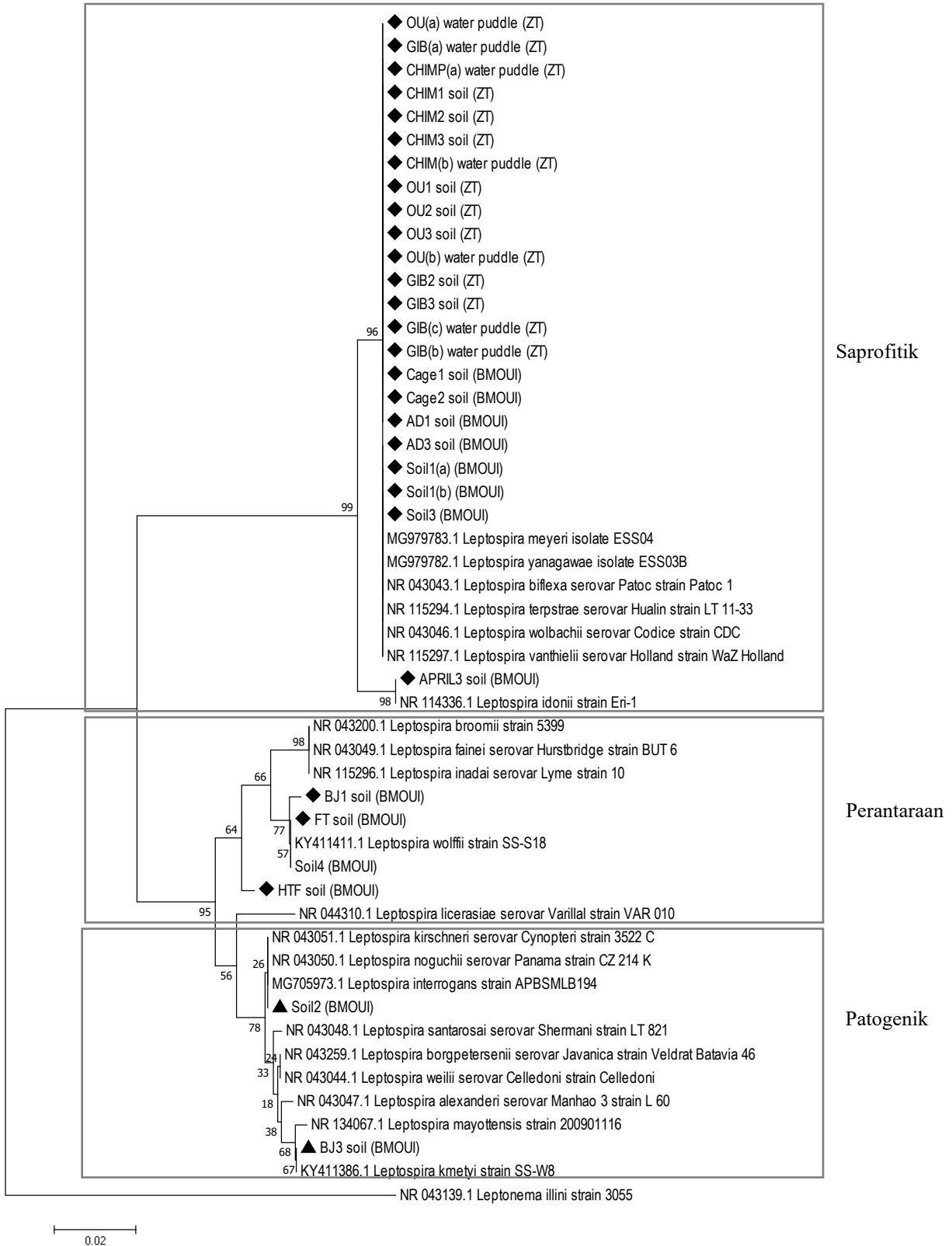
RAJAH 1. Contoh beberapa kultur *Leptospira* daripada sampel tanah BMOUI dan Zoo Taiping yang berjaya mengamplifikasi gen 16S *rRNA*. Sampel kultur dianggap positif *Leptospira* apabila menghasilkan jalur sebaris dengan kawalan positif (P) pada saiz 454 pb. Telaga 1: Blank (BI), telaga 2: kawalan negatif (N), telaga 3-6: kultur *Leptospira* dari tanah BMOUI, telaga 7: penanda (M), telaga 8-12: kultur *Leptospira* dari tanah Zoo Taiping dan telaga 13: kawalan positif (P)

Pohon filogeni berdasarkan kaedah hubungan jiran dengan nilai butstrap 1000 telah mengelaskan jujukan teramplifikasi gen 16S *rRNA* dan jujukan rujukan kepada tiga klad yang berbeza iaitu spesies saprofitik, perantaraan dan patogenik (Rajah 2).

Semua sampel persekitaran Zoo Taiping, 15/15 kultur merupakan spesies saprofitik iaitu *L. yanagawae* dan *L. meyeri* dengan jarak genetik antara spesies adalah 0.00 (Rajah 2). Bagi sampel persekitaran BMOUI pula, sebanyak 8/14 kultur tanah telah dikenal pasti sebagai spesies saprofitik iaitu *L. yanagawae*, *L. meyeri* dan *L. idonii* dengan jarak genetik antara spesies adalah 0.00-0.02 (Rajah 2). Kajian lepas oleh Saito et al. (2013) dan Scialfa et al. (2017) juga menunjukkan sampel sekitaran di kawasan kajian masing-masing didominasi oleh spesies *L. yanagawae* and *L. meyeri* berdasarkan analisis filogeni 16S *rRNA*. Hal ini adalah kerana kebolehan spesies saprofitik yang hidup bebas di persekitaran tanpa memerlukan sebarang perumah menyebabkan bakteria jenis ini boleh dijumpai dengan banyak di tanah lembap dan air. Tambahan pula, iklim di negara ini yang panas

dan lembap sepanjang tahun juga menyumbang kepada keadaan yang kondusif untuk kemandirian *Leptospira* pada persekitaran (Benacer et al. 2016). Namun, kajian oleh Chiani et al. (2016) telah melaporkan *L. meyeri* juga berjaya dikesan dalam sampel klinikal meskipun kejangkitan dan kepatogennya masih tidak jelas.

Selain itu, sebanyak empat kultur tanah BMOUI telah dikenal pasti sebagai spesies perantaraan iaitu *L. wolffii* dengan jarak genetik antara spesies adalah dalam lingkungan 0.00-0.01 manakala hanya dua pencilan sahaja diperoleh daripada sampel tanah BMOUI dikenal pasti sebagai *Leptospira* patogenik (Rajah 2). Strain 'Soil2' terletak berhampiran dengan spesies *L. interrogans* manakala strain 'BJ3 soil' pula dengan *L. kmetyi* dengan masing-masing mempunyai jarak genetik antara spesies sebanyak 0.00. Bilangan *Leptospira* patogenik yang dijumpai adalah sedikit berbanding saprofitik kerana spesies ini kurang beradaptasi terhadap kondisi persekitaran berbanding spesies saprofitik dan memerlukan perumah untuk membiak serta bermandiri (Barragan et al. 2011).



RAJAH 2. Pohon filogeni berdasarkan kaedah hubungan jiran dengan butstrap 1000 yang dibangunkan daripada jujukan gen 16S *rRNA* dan jujukan rujukan NCBI. Jujukan *Leptonema illini* pula digunakan sebagai kumpulan luar. Kultur dari BMOUI dan Zoo Taiping (ZT) ditandakan dengan ◆. Penjenisan jujukan multi-lokus (MLST) dijalankan pada sampel yang bertanda ▲. Bar skala menandakan penggantian nukleotida bagi setiap tapak. 'Water puddle' = lopak air/takungan air; soil = tanah

PENCIRIAN KULTUR *Leptospira* spp. PATOGENIK MELALUI MLST

Hasil keputusan MLST yang dilakukan ke atas kultur patogenik 'Soil2' menunjukkan pencilan ini berjaya mengamplifikasi lima daripada tujuh gen penyelenggara (berdasarkan skema 1) dan perbandingan lima jujukan tersebut dengan pangkalan data pubMLST telah menjana profil alel separa lengkap (*pntA*: 71, *sucA*: 1, *tpiA*: 13, *mreA*: 3, *caiB*: 6). Hasil daripada gabungan profil alel ini, spesies *L. interrogans* serovar Lai Langkawi (nilai ST: 236) merupakan padanan terdekat dengan pencilan 'Soil2'. Berdasarkan kajian lepas, terdapat seekor orang utan BMOUI telah menunjukkan tindak balas terhadap serovar Lai Langkawi dalam ujian darah yang dilakukan (Nadia et al. 2019). Hal ini menandakan orang utan tersebut telah menghasilkan antibodi terhadap serovar ini disebabkan pendedahan berterusan dengan tanah tercemar di kawasan sekitarnya. Serovar Lai juga merupakan punca utama jangkitan penyakit leptospirosis dalam kalangan pelancong yang terlibat dalam aktiviti eko-pelancongan di Malaysia (Sejvar et al. 2003).

Pencilan patogenik 'BJ3 soil' pula tidak dapat dibandingkan dengan pangkalan data pubMLST kerana setiap jujukannya adalah tidak sepadan dan mempunyai perbezaan besar dengan jujukan rujukan. Oleh itu, pencilan ini telah diberi profil alel baharu yang lengkap (*glmU*: 70, *pntA*: 79, *sucA*: 75, *tpiA*: 69, *pfkB*: 96, *mreA*: 73, *caiB*: 64) dan didaftarkan dalam pangkalan data pubMLST sebagai pencilan baharu. Gabungan profil alel ini menjana nilai ST baharu iaitu 262 di bawah spesies *L. kmetyi*. Menurut Mohd Ali et al. (2018), *L. kmetyi* merupakan strain yang paling banyak dipencilkan daripada tanah di kawasan tempat tinggal pesakit leptospirosis di Kelantan dan Terengganu.

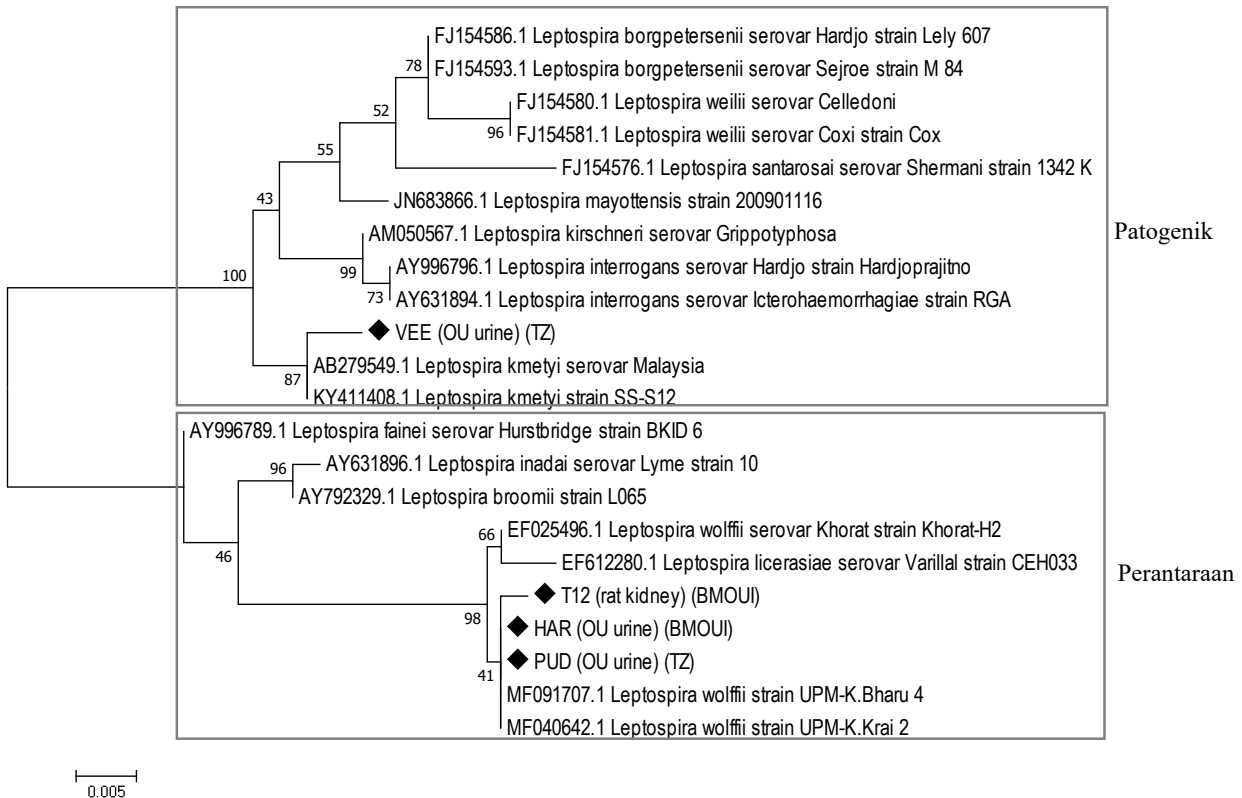
PENGESANAN DAN PENCIRIAN *Leptospira* spp. PADA SAMPEL HAIWAN (KULTUR NEGATIF) MELALUI GEN *RRS2*  
Kaedah pencirian *Leptospira* secara langsung terhadap sampel haiwan dilakukan kerana bakteria ini tidak berjaya dipencilkan melalui pengkulturan dalam media EMJH. Hal ini adalah kerana *Leptospira* khususnya spesies patogenik merupakan mikroorganisma sensitif. Menurut Boonsilp et al. (2011), haiwan tersebut mungkin dijangkiti dengan pencilan yang gagal untuk bermandiri dalam medium kultur yang biasa digunakan dalam makmal dan keadaan semula jadi lebih menyokong kemandirian bakteria ini. Hasilnya, beberapa sampel menunjukkan jangkitan tisu renal yang positif oleh bakteria ini melalui pengamplifikasian gen *rrs2*.

Sebanyak 1/23 sampel ginjal tikus ('T12') dan 1/12 sampel air kencing orang utan 'Harry' dari BMOUI berjaya mengamplifikasi gen *rrs2* dengan saiz jalur 452 pb. Berdasarkan pohon filogeni yang dibangunkan, kedudukan strain ini adalah berhampiran dengan spesies *L. wolffii* strain UPM-K.Bharu 4 dengan jarak antara spesies sebanyak 0.000-0.002 (Rajah 3). Memandangkan *L. wolffii*

telah dijumpai dalam sampel tanah (Rajah 2) serta sampel haiwan (Rajah 3) dari BMOUI, hal ini menunjukkan transmisi *L. wolffii* kepada sesetengah orang utan berlaku secara langsung daripada tikus yang dijangkiti serta tidak langsung melalui tanah yang tercemar. Jung et al. (2007) berpendapat bahawa tikus liar yang membawa *Leptospira* merupakan punca utama haiwan lain dalam kurungan mendapat jangkitan memandangkan tikus sahaja mampu bergerak bebas sekaligus menyebarkan bakteria *Leptospira* di kawasan yang dilawati. Menurut pengendali haiwan di BMOUI dan Zoo Taiping, tikus seringkali dilihat berkeliaran di sekitar kawasan orang utan dan kurungan mereka serta di tempat penyimpanan stok makanan haiwan. Tambahan pula, tikus merupakan sumber jangkitan bagi kes leptospirosis yang melibatkan 52 ekor monyet (*Cebus albifrons*, *C. capuchins* dan *C. apella*) yang dibela dalam kurungan di pusat rehabilitasi hidupan liar Colombia (Szonyi et al. 2011).

Bagi sampel dari Zoo Taiping pula, sebanyak 2/5 sampel air kencing orang utan ('Veera' dan 'Pudin') merupakan positif bagi gen *rrs2*. Kedudukan sampel 'Veera' dalam pohon filogeni adalah berhampiran dengan spesies *L. kmetyi* serovar Malaysia dengan jarak antara spesies bersamaan dengan 0.004 (Rajah 3). Sampel 'Pudin' pula adalah berhampiran dengan spesies *L. wolffii* strain UPM-K.Bharu 4 dengan jarak antara spesies adalah sebanyak 0.000 (Rajah 3). Walau bagaimanapun, oleh kerana semua pencilan daripada sampel persekitaran Zoo Taiping merupakan spesies saprofitik (Rajah 2), orang utan yang menunjukkan keputusan positif terhadap *Leptospira* patogenik dan perantaraan berkemungkinan mendapat jangkitan secara langsung melalui sesama perumah takungan.

Dalam kajian ini, kultur positif kebanyakannya terdiri daripada spesies saprofitik. Oleh itu, gen *rrs2* tidak digunakan dalam analisis filogeni kultur positif disebabkan oleh hanyutan jujukan yang rendah. Hal ini masih menjadi persoalan sama ada gen ini dapat memberikan sasaran yang optimum untuk membezakan antara *Leptospira* patogenik dan saprofitik (Ahmed et al. 2006; Haake et al. 2000). Walau bagaimanapun, primer gen *rrs2* masih digunakan untuk pengesanan dan pencirian spesies patogenik dan perantaraan kerana *rrs2* merupakan rantau 452-nukleotida pada gen 16S *rRNA* yang juga dikenali sebagai salah satu gen penyelenggara dalam MLST skema 3 (Ahmed et al. 2011). Pencirian lengkap MLST (berdasarkan penyasaran 7 gen penyelenggara) sehingga ke peringkat serovar tidak dapat dilakukan ke atas *Leptospira* patogenik dan perantaraan dalam sampel haiwan kerana kuantiti DNA yang amat sedikit. Oleh itu, pengesanan dan pencirian spesies melalui penyasaran *rrs2* adalah memadai. Hal ini disokong oleh kajian Boonsilp et al. (2011) yang juga menyasarkan gen *rrs2* untuk mengesan dan mencari *Leptospira* patogenik daripada sampel darah pesakit Thailand yang tidak berjaya dikultur.



RAJAH 3. Pohon filogeni berdasarkan kaedah hubungan jiran dengan butstrap 1000 yang dibangunkan daripada jujukan gen *rrs2* dan jujukan rujukan NCBI. Kultur dari BMOUI dan Zoo Taiping (ZT) ditandakan dengan ◆. Bar skala menandakan penggantian nukleotida bagi setiap tapak. 'OU urine' = air kencing orang utan; 'rat kidney' = ginjal tikus; VEE = Veera; HAR = Harry; PUD = Pudin

### KESIMPULAN

Persekitaran kawasan BMOUI dan Zoo Taiping masing-masing didominasi oleh kehadiran spesies *Leptospira* saprofitik kerana kebolehannya bermandiri di luar perumah. Walau bagaimanapun, perumah takungan seperti tikus dan orang utan di kedua-dua kawasan merupakan pembawa *Leptospira* patogenik dan perantaraan. Meskipun bilangan perumah yang dijangkiti adalah sedikit, namun interaksi/sentuhan sesama perumah haiwan boleh menyebabkan jangkitan baharu kepada perumah yang lain. Selain sentuhan secara langsung, transmisi *Leptospira* boleh berlaku melalui air kencing perumah takungan yang positif menyebabkan tanah dan air di sekitarnya tercemar dengan kehadiran bakteria ini. Hal ini dapat dilihat pada sampel tanah BMOUI yang positif dengan kehadiran beberapa strain *Leptospira* patogenik dan perantaraan. Oleh itu, langkah kawalan seperti menjaga kebersihan habitat orang utan dan sumber air mereka harus dipertingkatkan untuk mengurangkan jangkitan positif. Tempat yang berpotensi menjadi sarang tikus

hendaklah dimusnahkan bagi mengawal populasi tikus. Selain itu, orang utan di kedua-dua kawasan kajian perlu menjalani ujian saringan leptospirosis secara berkala sebelum dibebaskan ke habitat asal bagi mengelakkan transmisi kepada hidupan liar yang lain.

### PENGHARGAAN

Projek penyelidikan ini dibiayai oleh geran GUP-2016-021. Sekalung penghargaan diucapkan kepada Dr. Fairuz Amran, Ketua Jabatan Unit Bakteriologi Institut Penyelidikan Perubatan (IMR) kerana menyediakan kemudahan makmal untuk kajian ini. Kami juga ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada kakitangan IMR yang sudi berkongsi ilmu dan memberi bantuan teknikal sepanjang kajian ini dijalankan. Ribuan terima kasih juga diucapkan kepada Pengarah BMOUI serta Zoo Taiping kerana memberi kebenaran kepada kami untuk mengendalikan projek ini di kawasan pemuliharaan orang utan. Setinggi-tinggi penghargaan juga diucapkan kepada Dr. Sabapathy Dharmalingam dan Dr. Muhamad

Ridhwan Affendi serta pengendali haiwan lain yang turut terlibat secara langsung mahupun tidak langsung sepanjang kajian ini dijalankan.

#### RUJUKAN

- Ahmed, A., Thaipadungpanit, J., Boonsilp, S., Wuthiekanun, V., Nalam, K., Spratt, B.G., Aaensen, D.M., Smythe, L.D., Ahmed, N., Feil, E.J., Hartskeerl, R.A. & Peacock, S.J. 2011. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(11): e1374.
- Ahmed, N., Manjulata Devi, S., De los Á Valverde, M., Vijayachari, P., Machang'u, R.S., Ellis, W.A. & Hartskeerl, R.A. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5(1): 28.
- Arif, M.T. 2013. Changing nature of health crisis from infectious diseases and responses over three decades in Malaysia. *Borneo Journal of Resource Science and Technology* 2(2): 1-11.
- Barragan, V.A., Mejia, M.E., Trávez, A., Zapata, S., Hartskeerl, R.A., Haake, D.A. & Trueba, G.A. 2011. Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. *Current Microbiology* 62(6): 1802-1806.
- Baust, J.G. 2008. Strategies for the storage of DNA. *Cell Preservation Technology* 6(4): 251-252.
- Benacer, D., Thong, K.L., Verasahib, K.B., Galloway, R.L., Hartskeerl, R.A., Lewis, J.W. & Mohd Zain, S.N. 2016. Human leptospirosis in Malaysia: Reviewing the challenges after 8 decades (1925-2012). *Asia-Pacific Journal of Public Health* 28(4): 290-302.
- Benacer, D., Siti Nursheena, M.Z., Fairuz, A., Galloway, R.L. & Thong, K.L. 2013. Isolation and molecular characterization of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* isolates from the urban rat population of Kuala Lumpur, Malaysia. *The American Society of Tropical Medical and Hygiene* 88(4): 704-709.
- Bengis, R., Leighton, F., Fischer, J., Artois, M., Morner, T. & Tate, C. 2004. The role of wildlife in emerging and reemerging zoonoses. *Scientific and Technical Review* 23(2): 497-512.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E. & Vinetz, J.M. 2003. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* 3(12): 757-771.
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M.S., Holden, M.T.G., Zhang, C., Jiang, X., Koizumi, N., Taylor, K., Galloway, R., Hoffmaster, A.R., Craig, S., Smythe, L.D., Hartskeerl, R.A., Day, N.P., Chantratita, N., Feil, E.J., Aanensen, D.M., Spratt, B.G. & Peacock, S.J. 2013. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(1): e1954.
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Limmathurotsakul, D., Day, N.P. & Peacock, S.J. 2011. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infectious Diseases* 11(1): 338.
- Cantu, A., Ortega-S, J.A., Mosqueda, J., Garcia-Vazquez, Z., Henke, S. & George, J. 2008. Prevalence of infectious agents in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. *Journal of Wildlife Diseases* 44(4): 1002-1007.
- Chiani, Y., Jacob, P., Varni, V., Lamdolt, N., Schmeling, M.F., Pujato, N., Caimi, K. & Vanasco, B. 2016. Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 37(2016): 245-251.
- Dechner, A. 2013. A retrospective analysis of the leptospirosis research in Columbia. *Journal of Infection in Developing Countries* 8(3): 258-264.
- Dietrich, M., Muhdorfer, K., Tortosa, P. & Markotter, W. 2015. *Leptospira* and bats: Story of an emerging friendship. *PLoS Pathogens* 11(11): e1005176.
- Djadid, N.D., Ganji, Z.F., Gouya, M.M., Rezvani, M. & Zakeri, S. 2009. A simple and rapid nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 63(3): 251-256.
- Famatiga, E.G. 1973. Leptospirosis in Philippine monkeys. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 4(3): 316-318.
- Francis, C.M. & Barrett, P. 2008. *Guide to the Mammals of Southeast Asia*. Princeton: Princeton University Press. pp. 1-392.
- Haake, D.A., Chao, G., Zuerner, R.L., Barnett, J.K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P.N. & Bolin, C.A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity* 68(4): 2276-2285.
- Jalil, M.F.B. 2009. Comparative phylogeography of three primate species in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary, Sabah, Malaysia. PhD Thesis. Cardiff University, UK (Unpublished).
- Jung, B.Y., Choi, J.S., Kim, K.T., Song, Y.K., Lee, S.H., Lee, K.W., Kim, J.Y. & Moon, O.K. 2007. Seroprevalence of leptospirosis in Korean municipal zoo animals. *Journal of Veterinary Medical Science* 69(8): 861-863.
- Kilbourn, A.M., Karesh, W.B., Wolfe, N.D., Bosi, E.J., Cook, R.A. & Andau, M. 2003. Health evaluation of free-ranging and semi-captive orang utans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. *Journal of Wildlife Diseases* 39(1): 73-83.
- LaRocque, R.C., Breiman, R.F., Ari, M.D., Morey, R.E., Janan, F.A., Hayes, J.M., Hossain, M.A., Brooks, W.A. & Levett, P.N. 2005. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases Journal* 11(5): 766-769.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 14(2001): 296-326.
- Mohd Ali, M.R., Mohammad Safiee, A.W., Yusof, N.Y., Fauzi, M.H., Yean, C.Y. & Ismail, N. 2018. Isolation of *Leptospira kmetyi* from residential areas of patients with leptospirosis in Kelantan, Malaysia. *Journal of Infection and Public Health* 11(2018): 578-580.



- Nadia, A.S., Md-Zain, B.M., Dharmalingam, S., Fairuz, A. & Hani-Kartini, A. 2019. Serological survey of leptospirosis in high-risk rangers and wild animals from *ex-situ* captive centers. *Tropical Biomedicine* 36(2): 443-452.
- Pavlin, B.I., Schloegel, L.M. & Daszak, P. 2009. Risk of importing zoonotic diseases through wildlife trade, United States. *Emerging Infectious Diseases Journal* 15(11): 1721-1726.
- Scialfa, E., Grune, S., Brihuega, B., Aguirre, P. & Rivero, M. 2017. Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 50(3): 323-326.
- Saito, M., Villanueva, S., Chakraborty, A., Miyahara, S., Segawa, T., Asoh, T., Ozuru, R., Gloriani, N.G., Yanagihara, Y. & Yoshida, S. 2013. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 79(2): 601-609.
- Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K., Kaiser, R., Marano, N., Popovic, T., Tappero, J.W., Ashford, D., Mascola, L., Vugia, D., Perkins, B., Rosenstein, N. & the Eco-Challenge Investigation Team. 2003. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerging Infectious Diseases* 9(6): 702-707.
- Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F. & Smythe, L.D. 2006. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004. *Epidemiology and Infection* 134(6): 1217-1225.
- Szonyi, B., Agudelo-Flórez, P., Ramírez, M., Moreno, N. & Ko, A.I. 2011. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (Cebus) monkeys. *Veterinary Journal* 2188(2): 237-239.
- Thayaparan, S., Robertson, I.D. & Abdullah, M.T. 2014. Leptospiral agglutinins in captive and free ranging non-human primates in Sarawak, Malaysia. *Veterinary World* 7(6): 428-431.
- Vijayachari, P.I., Sugunan, A.P. & Shriram, A.N. 2008. Leptospirosis: An emerging global public health problem. *Journal of Biosciences* 33(4): 557-569.
- Nadia Aqilla Shamsusah & Hani-Kartini Agustar\*  
 Pusat Sains Bumi dan Alam Sekitar  
 Universiti Kebangsaan Malaysia  
 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan  
 Malaysia
- Badrul Munir Md Zain  
 Pusat Integratif Biologi  
 Universiti Kebangsaan Malaysia  
 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan  
 Malaysia
- Sabapathy Dharmalingam  
 Yayasan Pulau Orang Utan Bukit Merah  
 34400 Semanggol, Perak Darul Ridzuan  
 Malaysia
- Fairuz Amran  
 Jabatan Bakteriologi  
 Institut Penyelidikan Perubatan  
 50588 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan  
 Malaysia
- \*Pengarang untuk surat-menyurat; email: hani\_ag@ukm.edu.my
- Diserahkan: 18 Julai 2019  
 Diterima: 24 Jun 2020