

EFEK DESINFEKTAN TERHADAP *Leptospira interrogans* serovar hardjo

Riyandini Putri*, Susanti, dan Andi Mulyadi

Pusat Riset Veteriner, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Bogor, Indonesia

*Email korespondensi: riyandini.putri@brin.go.id

Abstrak. Leptospirosis merupakan penyakit zoonosis disebabkan oleh bakteri *Leptospira* patogen yang dapat menginfeksi hewan ternak, hewan liar, dan juga manusia. Hewan yang terinfeksi dapat menyebarluaskan bakteri ke lingkungan melalui urine dan menjadi sumber infeksi bagi hewan lain dan juga manusia sehingga desinfeksi kandang dan lingkungan penting dalam upaya pengendalian penyakit. Desinfektan yang sering digunakan dan mudah diperoleh yaitu Virkon S dan sodium hipoklorit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Virkon S dan sodium hipoklorit terhadap daya hidup bakteri *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Kultur bakteri *Leptospira interrogans* serovar hardjo dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL ditambahkan dengan larutan sodium hipoklorit dan Virkon S hingga menghasilkan campuran dengan konsentrasi 0,1%, 0,5%, dan 1% dan diinkubasi selama 5, 10, 15, 30, dan 45 menit. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop fase kontras. Hasil menunjukkan sodium hipoklorit dengan konsentrasi 1% paling cepat dapat mengeliminasi *L. interrogans* serovar hardjo pada menit ke-10 sedangkan Virkon S 0,1%, 0,5%, dan 1% belum dapat mengeliminasi bakteri pada pengamatan secara langsung hingga 45 menit. Sodium hipoklorit lebih efektif dibandingkan dengan Virkon S dalam mengeliminasi *L. interrogans* serovar hardjo. Oleh karena itu, peternak dianjurkan menggunakan sodium hipoklorit 1% untuk desinfeksi kandang dan lingkungan.

Kata kunci: desinfektan, Virkon S, sodium hipoklorit, *L. interrogans* serovar hardjo

Abstract. Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic *Leptospira* that can infect livestock, wild animals, and humans. Infected animals can spread bacteria into the environment through urine and become a source of infection for other animals as well as humans, so disinfection of barns and the environment is important in controlling the disease spread. Disinfectants that are often used and easily obtained are Virkon S and sodium hypochlorite. This study aims to determine the effect of Virkon S and sodium hypochlorite on the survival of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Cultures of *Leptospira interrogans* serovar hardjo bacteria with a concentration of 1.5×10^8 CFU/mL were added with sodium hypochlorite and Virkon S solutions to produce a mixture with concentrations of 0.1%, 0.5%, and 1% and incubated for 5, 10, 15, 30 and 45 minutes. Observations were done using a phase contrast microscope. The results showed that sodium hypochlorite with a concentration of 1% could eliminate *L. interrogans* serovar hardjo at 10 minutes while Virkon S 0.1%, 0.5%, and 1% could not eliminate bacteria on direct observation for up to 45 minutes. Sodium hypochlorite is more effective than Virkon S in eliminating *L. interrogans* serovar hardjo. Therefore, farmers are recommended to use 1% sodium hypochlorite for disinfection of barns and the environment.

Keywords: disinfectant, Virkon S, sodium hypochlorite, *L. interrogans* serovar hardjo

Pendahuluan

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang secara signifikan mempengaruhi kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Penyakit menular ini biasanya endemik di daerah dengan iklim tropis dan subtropis karena kelembaban yang tinggi. *Leptospira* dapat menginfeksi hospes seperti tikus, sapi, anjing, kambing, domba, dan babi, serta dapat mencemari sumber daya air dan tanah melalui urin hewan yang terinfeksi. *Leptospira* dapat bertahan hidup di air atau tanah dalam jangka waktu beberapa minggu atau bulan (Flores et al., 2020; McBride et al., 2005; Tappero et al., 2000). Suhu, kelembaban, dan curah hujan adalah faktor penting untuk kelangsungan hidup *Leptospira* (Astudillo et al., 2012). Manusia dapat terinfeksi melalui kontak langsung atau tidak langsung dengan air atau tanah yang terkontaminasi (Lilenbaum et al., 2009).

Variasi iklim, lingkungan pedesaan, dan pekerjaan dianggap sebagai faktor risiko penting. Penyakit ini diklasifikasikan sebagai risiko pekerjaan bagi dokter hewan, pembersih saluran pembuangan,

penambang, peternak, dan tentara (Bharti et al., 2003). Kejadian leptospirosis pada sapi di Indonesia telah dilaporkan sebelumnya (Mulyani et al., 2014; Sunaryo & Priyanto, 2022; Widiasih et al., 2021). Sapi dapat menularkan penyakit leptospirosis kepada peternak melalui lingkungan di sekitar kandang sapi. Kandang sapi biasanya berupa kandang terbuka atau kandang semi-terbuka. Kandang terbuka tidak disertai dinding penyekat sedangkan kandang semi-terbuka disertai dinding penyekat. Lantai kandang berupa lantai semen atau tanah. Lokasi kandang kebanyakan menyatu dengan rumah peternak sehingga menimbulkan resiko penularan penyakit zoonosis menjadi lebih tinggi (Alfanandyah et al., 2016; Nursanni et al., 2022; Putra et al., 2018). Oleh karena itu, desinfeksi sangat penting dalam manajemen peternakan dan biosekuriti.

Proses pembersihan harus mendahului proses desinfeksi karena jauh lebih mudah untuk mendesinfeksi permukaan yang tidak kotor dengan bahan organik (Fukuzaki, 2006). Teknik desinfeksi yang paling sering diterapkan adalah menggunakan bahan kimia. Tujuan dari pembersihan dan desinfeksi adalah untuk menghilangkan materi organik dengan menggunakan metode pembersihan fisik dan berbasis air, serta membunuh mikroorganisme yang tersisa dengan menggunakan disinfektan kimia dan pengeringan alami serta menjaga area bebas dari hewan ternak pada proses pengeringan (Hancox et al., 2013). Evaluasi efektivitas disinfektan harus menjadi prioritas untuk memilih disinfektan yang sesuai untuk meminimalkan jumlah mikroba (Saha et al., 2020). Virkon S (Antec™ International, Sudbury, Suffolk, UK) merupakan disinfektan oksidatif komersial yang digunakan untuk melawan berbagai bakteri, spora, jamur, dan virus. Bahan kimia aktif Virkon S adalah potassium peroxymonosulphate (21,41%) dan sodium klorida (1,5%) dengan penyanga anorganik (Gabbert et al., 2018). Sodium hipoklorit dikenal sebagai referensi disinfektan untuk desinfeksi (Moslehifard et al., 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Virkon S dan sodium hipoklorit terhadap daya hidup bakteri *Leptospira interrogans* serovar hardjo.

Materi dan Metode Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikroskop, timbangan, botol, tabung, *microtube*, *micropipette*, *microtips*, rak sampel, centrifuge, *stirrer*, skala McFarland *digital*, dan inkubator. Bahan yang digunakan meliputi larutan sodium hipoklorit, Virkon S, kultur *Leptospira interrogans* serovar hardjo umur 6 hari, aquades steril, dan media kultur Ellinghausen, McCullough, Johnson, dan Harris (EMJH).

Pembuatan Larutan Desinfektan

Larutan sodium hipoklorit dan Virkon S dengan konsentrasi 0,2%, 1%, dan 2% dibuat dalam pelarut aquades steril.

Pembuatan Larutan Kultur Bakteri

Kultur bakteri *Leptospira interrogans* serovar hardjo dalam media Ellinghausen, McCullough, Johnson, dan Harris (EMJH) sebanyak 6 mL disentrifus kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan aquades steril sebanyak 100 µL. Aquades steril sebanyak 4 mL dimasukkan pada tabung kemudian ditambahkan larutan bakteri sampai skala McFarland menunjukkan skala 0,5 dimana konsentrasi bakteri adalah $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Uji Pengaruh Disinfektan terhadap Daya Hidup Bakteri

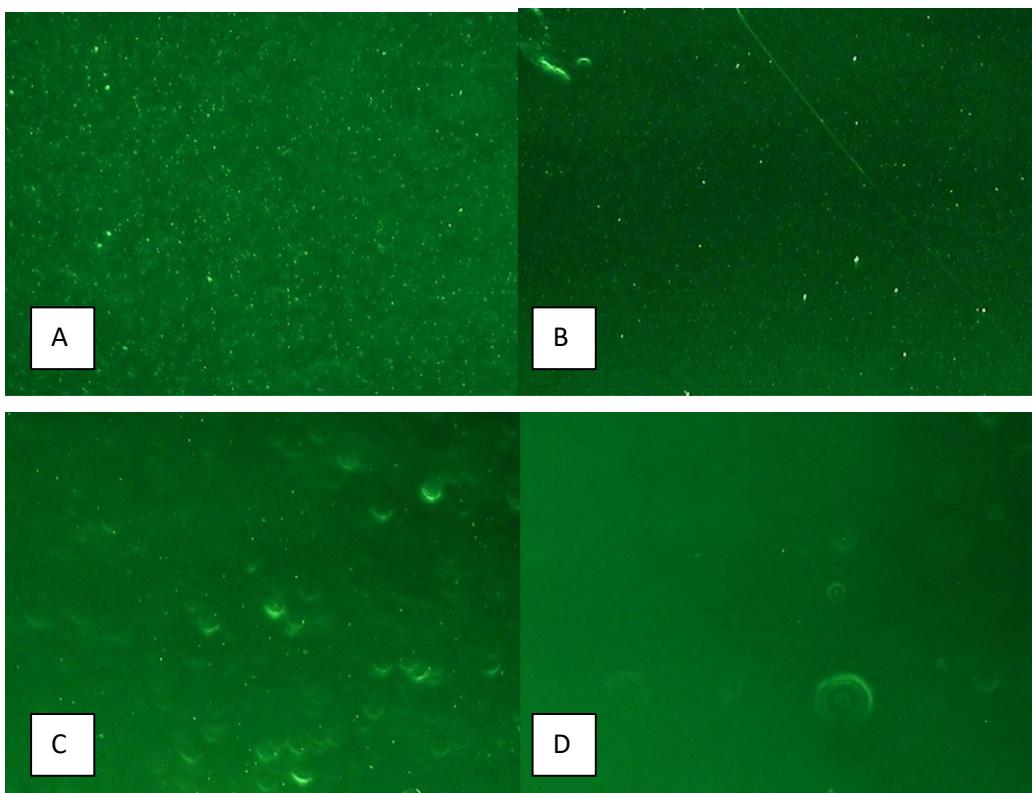
Larutan kultur bakteri sebanyak 300 µL dan cairan disinfektan atau kontrol (aquades steril) dicampur dengan jumlah yang sama sehingga konsentrasi menjadi 0,1%, 0,5%, dan 1% lalu diamati

pada menit ke 5, 10, 15, 30, dan 45 di mikroskop fase kontras dengan perbesaran 1×10 . Pada saat yang sama sebanyak $100 \mu\text{L}$ campuran ditambahkan pada media kultur $900 \mu\text{L}$ dan diinkubasi pada suhu 37°C kemudian dilakukan pengamatan setelah 7 hari.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengamatan pada mikroskop fase kontras dilakukan dua kali yaitu pengamatan langsung pada saat desinfektan ditambahkan serta pengamatan setelah campuran bakteri dan desinfektan ditumbuhkan pada media kultur selama 7 hari. Pengamatan langsung dilakukan pada menit 5, 10, 15, 30, dan 45 setelah desinfektan ditambahkan pada bakteri. Hasil pengamatan dibuat skala 0, 1, 2, atau 3 berdasarkan bakteri yang terlihat. Skala pengamatan pada mikroskop fase kontras dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil pengamatan langsung dapat dilihat pada Tabel 1. Pengamatan dilakukan terhadap kontrol, sodium hipoklorit 0,1%, sodium hipoklorit 0,5%, sodium hipoklorit 1%, Virkon S 0,1%, Virkon S 0,5%, dan Virkon S 1% yang ditambahkan dengan bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$. Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa Virkon S 0,1% belum mampu mengeliminasi *Leptospira interrogans* serovar hardjo hingga menit ke-45. Virkon S 0,5% dan Virkon S 1% dapat mengurangi *L. interrogans* serovar hardjo namun belum dapat mengeliminasi bakteri hingga pengamatan langsung selama 45 menit.



Gambar 1. Skala pengamatan 0, 1, 2, dan 3 pada mikroskop fase kontras dengan perbesaran 1×10 . (A) Skala 3 tampak pada perlakuan VirkonTMS 0,1% waktu pengamatan 5 menit. (B) Skala 2 tampak pada perlakuan sodium hipoklorit 0,5% waktu pengamatan 5 menit. (C) Skala 1 tampak pada perlakuan sodium hipoklorit 0,1% waktu pengamatan 10 menit. (D) Skala 0 tampak pada perlakuan sodium hipoklorit 1% waktu pengamatan 30 menit.

Hasil pengamatan langsung pada desinfektan sodium hipoklorit konsentrasi 0,1% dan 0,5% dengan waktu 15 menit sudah dapat mengeliminasi bakteri *L. interrogans* serovar hardjo. Sodium hipoklorit dengan konsentrasi 1% dapat lebih cepat mengeliminasi *L. interrogans* serovar hardjo yaitu pada menit ke-10. Hasil ini diperoleh tanpa adanya faktor lingkungan seperti tanah yang dapat mengurangi efikasi desinfektan. Pada lantai kandang, tanah maupun debris lainnya perlu disingkirkan sebelum desinfeksi agar efikasi desinfektan optimal (Gold et al., 2013).

Tabel 1. Hasil pengamatan langsung pada mikroskop fase kontras.

Perlakuan	Waktu Pengamatan				
	5 Menit	10 Menit	15 Menit	30 Menit	45 Menit
Kontrol	3	3	3	3	3
Sodium hipoklorit 0,1%	2	1	0	0	0
Sodium hipoklorit 0,5%	2	1	0	0	0
Sodium hipoklorit 1%	1	0	0	0	0
Virkon S 0,1%	3	3	3	3	3
Virkon S 0,5%	2	2	2	1	1
Virkon S 1%	2	2	2	1	1

Hasil pengamatan setelah 7 hari menunjukkan bahwa tidak terdapat adanya bakteri pada semua kultur bakteri yang ditambahkan desinfektan. Hal ini dapat diakibatkan oleh sedikitnya jumlah bakteri karena telah didilusikan beberapa kali sehingga setelah ditanam pada kultur, bakteri tidak dapat hidup kembali.

Hingga saat ini, terdapat 17 spesies *Leptospira* yang masuk ke dalam kelompok patogen (kelompok P1), 21 spesies dalam kelompok menengah (P2), dan 26 dalam dua kelompok saprofit (S1 dan S2) (Vincent et al., 2019). Genom bakteri terdiri dari dua kromosom melingkar yang lebih besar dibandingkan spiroseta lain dan lebih beragam dibandingkan kebanyakan genus bakteri lainnya (Picardeau et al., 2008) karena transfer gen horizontal yang signifikan dan duplikasi gen (Xu et al., 2016). Hal ini berpotensi memfasilitasi peningkatan kemampuan bakteri untuk bertahan hidup pada berbagai inang seperti manusia, hewan peliharaan, dan hewan liar; kondisi lingkungan seperti tanah dan air; serta iklim seperti tropis, sedang, dan lain-lain (Bharti et al., 2003; Xu et al., 2016). Bakteri *Leptospira* telah terbukti dapat bertahan hidup di air selama beberapa hari hingga lebih dari satu tahun (Bierque et al., 2020; Warnasekara et al., 2022). Oleh karena itu, desinfeksi sangat penting untuk mengeliminasi bakteri yang ada pada lingkungan.

Efektivitas sodium hipoklorit (NaOCl) dipengaruhi oleh ketersediaan klorin (*available chlorine*) dan pH larutan. Asam hipoklorit (HOCl) adalah asam lemah yang memisah menjadi proton (H^+) dan ion hipoklorit (ClO^-), tergantung dari pH cairan, dan merupakan spesies aktif pada aktivitas germisidal (Fukuzaki, 2006). Sodium hipoklorit telah dilaporkan dapat menghambat dan mengeliminasi biofilm *Klebsiella pneumoniae* dengan resistensi obat berbeda, yaitu pada kelompok sensitif (kelompok bakteri liar), *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) dan *carbapenem-resistant K. pneumoniae* (CRKP). Efek ini dapat ditingkatkan dengan menaikkan konsentrasi hingga kisaran konsentrasi bakteriostatik dan bakterisidal (Huang et al., 2022). Pada penelitian ini, sodium hipoklorit dengan konsentrasi 0,1%, 0,5%, dan 1% memiliki efek mengeliminasi terhadap *L. interrogans* serovar hardjo. Sodium hipoklorit 1% lebih efektif dibandingkan sodium hipoklorit 0,1% dan 0,5% dilihat dari waktu yang dibutuhkan untuk mengeliminasi bakteri.

Desinfektan Virkon S 1% memiliki aktivitas bakterisidal setelah terpapar selama 5 menit terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, dan

Mycobacterium smegmatis (Hernandez et al., 2000) serta dilaporkan dapat mereduksi jumlah *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella enterica* dengan metode *fogging* dalam waktu 2 jam (Dunowska et al., 2005). Lapisan lipopolisakarida yang merupakan lapisan luar bakteri Gram-negatif dapat mengurangi aktivitas biosidal, termasuk agen aktif-membran, seperti pada Virkon S (Maillard, 2018). Membran luar *Leptospira* kaya akan lipopolisakarida yang mirip dengan struktur bakteri Gram negatif (Haake & Zuckert, 2014) sehingga dapat mengurangi aktivitas biosidal Virkon S. Pada penelitian ini, Virkon S dengan konsentrasi 0,1%, 0,5%, dan 1% belum sepenuhnya dapat mengeliminasi *L. interrogans* serovar hardjo pada pengamatan langsung hingga 45 menit.

Penelitian lain juga mengungkapkan bahwa Virkon S 1% memberikan efek desinfeksi total terhadap *S. aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, namun tidak memberikan efek pada *Bacillus subtilis* (ver. niger). Hal ini berbeda dengan semprotan sodium hipoklorit 0,062% yang sudah dapat mendesinfeksi semua sampel yang diinokulasi dengan *P. aeruginosa*, *S. aureus*, dan *B. subtilis* (Moslehifard et al., 2015). Dari hasil penelitian di atas dapat diketahui bahwa sodium hipoklorit lebih efektif dibandingkan dengan Virkon S. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang kami lakukan yaitu sodium hipoklorit lebih efektif dalam mengeliminasi *L. interrogans* serovar hardjo dibandingkan dengan Virkon S.

Kesimpulan

Sodium hipoklorit lebih efektif dibandingkan dengan Virkon S dalam mengeliminasi *L. interrogans* serovar hardjo. Peternak dapat menggunakan sodium hipoklorit sebagai desinfektan untuk mengeliminasi *L. interrogans* serovar hardjo karena lebih efektif dibandingkan dengan Virkon S.

Daftar Pustaka

- Alfanandyah, Z., SK Widystuti, IH Utama, MP Profesi, dan D Hewan. 2016. Bentuk dan Kelainan Kuku Sapi Bali yang Dipelihara dalam Kandang Berlantai Keras. *Indonesia Medicus Veterinus Januari*. 5(1): 23–29.
- Astudillo, VG, DW Hernández, JP Stadlin, LA Bernal, DAL Rodríguez, dan MA Hernández. 2012. Comparative seroprevalence of *Leptospira interrogans* in Colombian mammals along a climatic gradient. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 43(4) : 768–775.
- Bharti, AR, JE Nally, JN Ricaldi, MA Matthias, MM Diaz, MA Lovett, PN Levett, RH Gilman, MR Willig, E Gotuzzo, dan JM Vinetz. 2003. *Leptospirosis*: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases*, 3 : 757–771.
- Bierque, E., R Thibeaux, D Girault, ME Soupé-Gilbert, dan C Goarant. 2020. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE*, 15(1)
- Dunowska, M., PS Morley, dan DR Hyatt. 2005. The effect of Virkon®S fogging on survival of *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* on surfaces in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*, 105(3–4), 281–289.
- Flores, B., K Escobar, JL Muzquiz, J Sheleby-Elías, B Mora, E Roque, D Torres, A Chávez, dan W Jirón. 2020. Detection of pathogenic *leptospires* in water and soil in areas endemic to leptospirosis in Nicaragua. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 5(3) : 1–10.
- Fukuzaki, S. 2006. Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Science*, 11(4) : 147–157.
- Gabbert, LR, JD Smith, JG Neilan, GS Ferman, dan Mv Rasmussen. 2018. Smart Card Decontamination in a High-Containment Laboratory. *Health Security*. 16(4) : 244–251.
- Gold, KK, PD Reed, DA Bemis, DL Miller, MJ Gray, dan JM Souza. 2013. Efficacy of common disinfectants and terbinafine in inactivating the growth of *Batrachochytrium dendrobatidis* in culture. *Diseases of Aquatic Organisms*. 107(1) : 77–81.
- Haake, DA., dan WR Zuckert. 2014. The leptospiral outer membrane. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387 : 187–221.
- Hancox, L. R., le Bon, M., Dodd, C. E. R., & Mellits, K. H. (2013). Inclusion of detergent in a cleaning regime and effect on microbial load in livestock housing. *Veterinary Record*, 173(7), 167.

- Hernandez, A., Martró, E., Matas, L., Martín, M., & Ausina, V. (2000). Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon® against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. *Journal of Hospital Infection*, 46(3), 203–209.
- Huang, C., S Tao, J Yuan, dan X Li. 2022. Effect of sodium hypochlorite on biofilm of *Klebsiella pneumoniae* with different drug resistance. *American Journal of Infection Control*. 50(8) : 922–928.
- Jittimanee, J dan J Wongbutdee, J. 2019. Prevention and control of leptospirosis in people and surveillance of the pathogenic Leptospira in rats and in surface water found at villages. *Journal of Infection and Public Health*. 12(5) : 705–711.
- Lilienbaum, W., R Vargas, P Ristow, A Cortez, SO Souza, LJ Richtzenhain, dan SA Vasconcellos. 2009. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science*. 87(1) : 16–19.
- Maillard, JY. 2018. Resistance of Bacteria to Biocides. *Microbiology Spectrum*, 6(2).
- McBride, AJA., DA Athanazio, MG Reis, dan AI Ko. 2005. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18 : 376–386.
- Moslehifard, E., F Lotfipour, MR Anaraki, E Shafee, S Tamjid-Shabestari, T Ghaffari, dan E Moslehifard. 2015. Efficacy of Disinfection of Dental Stone Casts: Virkon Versus Sodium Hypochlorite. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*. 12(3) : 206–215.
- Mulyani, GT, B Sumiarto, dan Yurianti. 2014. Pembelian Ternak dan Kelembaban Tinggi Merupakan Faktor Risiko Leptospirosis pada Sapi di Girimulyo, Kulon Progo, Jogjakarta. *Jurnal Veteriner*, 15(2) : 199–204.
- Nursanni, B., DM Yulanto, dan S Rahmadani. 2022. Pembinaan Desinfeksi Kandang pada Peternakan Rakyat Sebagai Upaya Pencegahan Wabah Penyakit Mulut dan Kuku. *SAFARI :Jurnal Pengabdian Masyarakat Indonesia*. 2(4) : 101–108.
- Picardeau, M., DM Bulach, C Bouchier, RL Zuerner, N Zidane, PJ Wilson, S Creno, ES Kuczek, S Bommezzadri, JC Davis, A McGrath, MJ Johnson, C Boursaux-Eude, T Seemann, Z Rouy, RL Coppel, JI Rood, A Lajus, JK Davies, B Adler. 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE*. 3(2).
- Putra, F. Alian Hidayat, dan T Afirianto. 2018. Penentuan Kelayakan Kandang Sapi Menggunakan Analytic Hierarchy Process-Weighted (AHP-WP) [Studi Kasus UPT Pembibitan Ternak Dan Hijauan Makanan Ternak Singosari]. *Jurnal Pengembangan Teknologi Informasi Dan Ilmu Komputer*. 2(10) : 2548–2964.
- Saha, O., Rakhi, N. N., Istiaq, A., Islam, I., Sultana, M., Hossain, M. A., & Rahaman, M. M. (2020). Evaluation of Commercial Disinfectants against *Staphylococcus lentus* and *Micrococcus* spp. Of Poultry Origin. *Veterinary Medicine International*, 2020.
- Sunaryo, S., & Priyanto, D. (2022). Leptospirosis in rats and livestock in Bantul and Gunungkidul district, Yogyakarta, Indonesia. *Veterinary World*, 15(6), 1449–1455.
- Tappero JW, Ashford DA, Perkins BA. *Leptospira species (leptospirosis)*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*, Vol.2, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p.2495–501
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Khalid, M. K. N. M., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Korba, A. A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., & Picardeau, M. 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5).
- Warnasekara, J., Srimantha, S., Senavirathna, I., Kappagoda, C., Farika, N., Nawinna, A., & Agampodi, S. 2022. The variable presence of *Leptospira* in the environment; an epidemiological explanation based on serial analysis of water samples. *PLoS ONE*, 17(2).
- Widiasih, D. A., Lindahl, J. F., Artama, W. T., Sutomo, A. H., Kutanebara, P. M., Mulyani, G. T., Widodo, E., Djohan, T. S., & Unger, F. 2021. Leptospirosis in ruminants in yogyakarta, indonesia: A serological survey with mixed methods to identify risk factors. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(2).
- Xu, Y., Zhu, Y., Wang, Y., Chang, Y. F., Zhang, Y., Jiang, X., Zhuang, X., Zhu, Y., Zhang, J., Zeng, L., Yang, M., Li, S., Wang, S., Ye, Q., Xin, X., Zhao, G., Zheng, H., Guo, X., & Wang, J. (2016). Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Scientific Reports*, 6.