

ABSTRACT

Cholera epidemics have occurred in Malaysia since 1991 till 2003 which can be proved from the records by the Infectious Diseases Division of the Ministry of Health. Additionally, from 1994 to 2003, Sarawak saw a series of cholera epidemics. Cholera outbreaks in Malaysia are primarily caused by the El Tor O1 *Vibrio cholerae* serogroup. The aims of this study were to identify bacterial species from clinical and environmental samples (n=28) from Limbang, Sarawak by collaboration with Sarawak Government Hospital by the approach of active case detection (ACD) and passive case detection (PCD), and to detect the toxin genes of the *V. cholerae* from the isolates. Apart from that, to determine the genetic relatedness of the isolates, to detect antibiotic susceptibility, and to determine the isolates' minimal biofilm eradication concentration (MBEC). All the isolates were sub-cultured in alkaline peptone water (APW). The boiled-cell method was used for DNA extraction. The total DNA extracted was amplified by polymerase chain reaction (PCR). In this work, two forms of PCR were used: 16S rRNA PCR and multiplex PCR. The results obtained from the study found out that 16 out of 28 (57.14 %) samples were confirmed to be *V. cholerae* species. Four primers specific for *V. cholerae* were used in multiplex PCR (O1 type, O139 type, *ctxA* and *ctxAB*) to confirm the species type and the toxin genes. All samples shown positive for *V. cholerae* O1 serotype and 100% positive to all genes for the identification of *ctxA* and *ctxAB* genes. Following that, all 16 isolates were subjected to molecular typing using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR techniques. Antimicrobial testing was also performed using the disk-diffusion method and the MBEC method with chloramphenicol antibiotic. Sixteen confirmed *V. cholerae* O1 were successfully fingerprinted and demonstrated to be strain discriminating. Although all isolates were sensitive to Norfloxacin, they exhibited six distinct forms of

antimicrobial resistance. Finally, all isolates were eradicated at concentrations of 50 mg/mL and 100 mg/mL. Multiplex PCR was demonstrated in this work to be useful for research purposes in the field of molecular genetics including cholera outbreaks. Then, both RAPD-PCR and ERIC-PCR are suitable for profiling, and Norfloxacin can be utilised for future therapy because it shown 100 % susceptibility to all isolates in this research.

Keywords: *Vibrio cholerae* O1, *ctxAB* genes, polymerase chain reaction, antibiotic, MBEC

Kajian Molekul Wabak Vibrio cholerae di Limbang Sarawak

ABSTRAK

Wabak taun telah berlaku di Malaysia sejak tahun 1991 hingga 2003 yang boleh dibuktikan daripada rekod oleh Bahagian Penyakit Berjangkit Kementerian Kesihatan. Selain itu, terdapat juga wabak taun dari tahun 1994 hingga 2003 yang telah berlaku di Sarawak. Wabak taun di Malaysia kebanyakannya disebabkan oleh serogroup El Tor O1 Vibrio cholerae. Matlamat kajian ini adalah untuk mengenal pasti spesies bakteria daripada sampel klinikal dan persekitaran (n=28) dari Limbang, Sarawak dengan kerjasama Hospital Kerajaan Sarawak melalui pendekatan pengesanan kes aktif (ACD) dan pengesanan kes pasif (PCD), dan untuk mengesan gen toksin V. cholerae daripada isolat. Selain itu, kajian ini juga adalah untuk mengenal pasti perkaitan genetik antara sampel bakteria, mengesan kerentanan terhadap antibiotik dan menentukan minima kepekatan pembasmian biofilem (MBEC) bakteria. Kesemua isolat bakteria telah dibiakkan dalam air pepton beralkali (APW). Kaedah sel rebus digunakan untuk pengekstrakan DNA. Jumlah DNA yang diekstrak telah dikuatkan oleh tindak balas rantai polimerase (PCR). Dua jenis PCR telah digunakan dalam kajian ini iaitu PCR 16S rRNA dan PCR multipleks. Keputusan yang diperolehi daripada kajian mendapati 16 daripada 28 (57.14 %) sampel disahkan sebagai spesies V. cholerae. Empat primer khusus untuk V. cholerae telah digunakan dalam multipleks PCR (jenis O1, jenis O139, ctxA dan ctxAB) untuk mengesahkan jenis spesies dan gen toksin. Semua sampel menunjukkan keputusan positif untuk V. cholerae O1 serotype dan 100% positif kepada semua gen untuk pengenalpastian gen ctxA dan ctxAB. Kesemua 16 isolat bakteria kemudiannya diteruskan ke kaedah menaip molekul iaitu DNA polimorfik yang diperkuat secara rawak (RAPD)-PCR dan konsensus intergenik berulang bakteria (ERIC)-PCR. Ujian antimikrob dengan kaedah resapan cakera diuji berserta kaedah MBEC

menggunakan antibiotik kloramfenikol. Enam belas V. cholerae O1 berjaya diprofilkan dan menunjukkan diskriminasi antara strain. Semua isolat bakteria terdedah kepada Norfloxacin tetapi membentuk enam corak Profil Rintangan Antimikrob. Akhirnya, semua isolat telah dibasmi pada konsentrasi 50 mg/mL dan 100 mg/mL. Daripada kajian ini, ia menunjukkan bahawa PCR multipleks boleh digunakan untuk tujuan penyelidikan dalam bidang genetik molekul yang melibatkan wabak kolera. Kemudian, RAPD-PCR dan ERIC-PCR kedua-duanya sesuai untuk pemprofilan dan Norfloxacin boleh digunakan untuk terapi masa hadapan kerana ia menghasilkan 100 % kerentanan kepada semua isolat bakteria.

Kata kunci: Vibrio cholerae O1, ctxAB gen, tindak balas rantai polimerase, antibiotik, MBEC