

Declaration

This work was carried out at the department of microbiology and parasitology laboratory at medicinal and Aromatic plants research institute, National Center for Research, Ministry of Science and Technology,. Sudan, Khartoum

Acknowledgements

It is a pleasure to express my respect, sincere thanks and gratitude to my supervisor Dr. Humodi Ahmed Saeed for his supervision and encouragement during this study and writing of this thesis. Many thanks to associate professor Dr. Aisha Zoheir Almagboul and Dr. Ashraf Nabeel Abdorabo (Research assistant), who works at medical & Aromatic plants research institute. National center for research, (department of microbiology & Parasitology), for their help and advices during this study.

Great appreciation to medical laboratory technologist Abraham Alhag for his help and encouragement.

Great appreciation to Adheeb, and Jido Adam Eljali For their finicial aid and support.

Thanks are also extended to Dr. Hilal, Dean of school of medical laboratory technology (Sharg Elniel Collage) for his understanding and encouragement. Many thanks to lab technican Fatima Bakri for her help. Special gratitude to my family for their understanding and encouragement during the period of the work. Thanks to Altahir for his help in typing this thesis.

All thanks to my friends and colleagues for their kind help and to all those who contributed in any way in this study but not mentioned.

Abstract

This study was designed to investigate the *in vitro* activity of Erythromycin compared with Azithromycin and Clarithromycin against 50 strains of streptococcal species isolated from patients present with different diseases during the period between April to August 2003.

The results showed that Erythromycin has zones diameter of ≥ 19 mm and MIC of $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$ against susceptible strains of *S. pyogenes* and ≤ 11 mm, and MIC $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ for resistant strains. Zones diameter ≥ 20 mm and MIC $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ against susceptible strains of *S. agalactiae*; 14 mm, 1 $\mu\text{g/ml}$ against intermediate susceptible strains; ≤ 12 mm and $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ for resistant strains. Zones diameter ≥ 19 mm and MIC $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ against susceptible strains of *V. streptococci*; and ≤ 3 mm, with MIC of $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ for resistant strains.

The zone diameter of ≥ 18 mm and MIC $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ was recorded for susceptible strains of *S. pneumoniae*; while 17mm, 1 $\mu\text{g/ml}$ for intermediate susceptible strain; and ≥ 10 mm, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ for resistant strains. All strains of *Enterococcus faecalis* were resistant to these antibiotics with MIC $> 16 \mu\text{g/ml}$. The results also showed that 7 strains of *S. pyogenes* out of 10 were sensitive to these antibiotics and 3 strains resistant. Seven strains of *S. agalactiae* were susceptible to Erythromycin and Azithromycin, but 8 strains were susceptible to Clarithromycin; one strain was intermediate susceptible to Erythromycin and Azithromycin; 2 strains were resistant to these antibiotics. Two, 1 and 7, strains of *V. streptococci* were resistant, intermediate susceptible and susceptible respectively to these antibiotic. Three strains of *S. pneumoniae* were resistant but 1 and 6, strains were intermediate and susceptible to Erythromycin and Azithromycin respectively and 7 strains were

susceptible to Clarithromycin. The comparison indicated that Clarithromycin more active than Erythromycin and Azithromycin, also Erythromycin more active than Azithromycin.

ملخص

صدمت هذه الدراسة لتقييم فاعلية المضاد الحيوي أريثرومايسين و مقارنته ذلك بالأزيرزومايسين و الكلاريذرومايسين و ذلك باستخدام 50 سلالة من المكورات السبحية معزولة من مرضى يعانون من مظاهر مرضية متعددة، خلال الفترة من أبريل - أغسطس 2003 .

أظهرت النتائج أن أقل تركيز مانع لنمو الميكروب السبحي من النوع بايوجينس الحساس للإريثرومايسين هو أقل أو يساوي 0.5 ميكروجرام/مل و قطر منطقة إيقاف النمو أكبر أو يساوي 19 ملميترو أقل تركيز أكبر أو يساوي 4 ميكروجرام/مل مع قطر منطقة إيقاف النمو يساوي أو أقل من 11 ملميترو للنوع المقاوم للإريثرومايسين و أقل تركيز يساوي أو أقل من 0.5 ميكروجرام/مل و قطر منطقة إيقاف النمو يساوي أو أكبر من 20 ملميترو للميكروب السبحي من النوع أقاليشيا الحساس للإريثرومايسين و قطر منطقة إيقاف النمو يساوي 14 ملميترو مع أقل تركيز يساوي 1 ميكروجرام/مل للنوع متوسط الحساسية و قطر منطقة إيقاف النمو أقل أو يساوي 12 ملميترو مع أقل تركيز يساوي أو أكبر من 2 ميكروجرام/مل للنوع المقاوم للإريثرومايسين . قطر منطقة إيقاف النمو يساوي أو أكبر من 19 ملميترو مع أقل تركيز يساوي أو أقل من 0.5 ميكروجرام/مل للنوع الحساس من سلالة المكورات السبحية من النوع فريدانس و قطر منطقة إيقاف النمو يساوي أو أقل من 3.0 ملميترو مع أقل تركيز يساوي أو أكبر من 16 ميكروجرام/مل للنوع المقاوم للإريثرومايسين . قطر منطقة إيقاف النمو يساوي أو أكبر من 18 ملميترو مع أقل تركيز يساوي أو أقل من 0.5 ميكروجرام/مل للنوع الحساس من سلالة المكورات السبحية من النوع الرئوي و قطر منطقة إيقاف النمو يساوي 17 ملميترو مع أقل تركيز يساوي 1 ميكروجرام/مل للنوع متوسط الحساسية و

كذلك قطر منطقة إيقاف النمو أقل أو يساوي 10 ملمتر مع أقل تركيز يساوي أو أكبر من 4 ميكروجرام/مل للنوع المقاوم للعلاج. بل أنواع الأنتيروكوكس فيكالس م مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة هنا و أظهرت أقل تركيز أكبر من 16 ميكروجرام/مل. المقارنة أظهرت أن المضاد الحيوي كلاريزرومايسين و أيضا الإريثرومايسين أكثر فاعلية من الأيزرومايسين و أيضا الإريثرومايسين أكثر فاعلية من الأيزرومايسين. أيضا النتائج أظهرت أن مجموع العشرة عزلات من المكورات السبحية من النوع بايوجينس سبعة كانت حساسة وثلاثة منها كانت م مقاومة لهذه المضادات الحيوية. سبعة من الأقاليشيا من مجموع عشرة عزلات كانت حساسة للإريثرومايسين و لأيزرومايسين، واحدة كانت متوسطة الحساسية للإريثرومايسين و الأيزرومايسين و إثنين منها كانت م مقاومة للعلاج، واحدة متوسطة الحساسية و سبعة منها كانت حساسة لهذه المضادات الحيوية من مجموع العشرة عزلات من العشرة عزلات الرئوية ثلاثة أنواع كانت م مقاومة للعلاج لكن واحدة كانت متوسطة الحساسية و ستة منها كانت حساسة للإريثرومايسين و الأيزرومايسين و سبعة عزلات منها كان حساس للكلاريزرومايسين.

Contents

	Page
Declaration	i
Acknowledgment	ii
Abstract	iii
ملخص	v
Table of contents	vii
List of tables	xii
List of Plates	xiii
Chapter One: Introduction	
1. Introduction	1
Chapter Two: Literature review	
2. Literature review.	3
2.1. Macrolides	3
2.1.1. History.	3
2.1.2. Chemical structure.	3
2.1.3. Classification.	4
2.1.4. Mechanism of action	4
2.1.5. Mechanism of resistance	5
2.1.6. Spectrum of Erythromycin.	5
2.1.7. Pharmacokinetic aspects	7
2.1.8. Side effects.	8
2.2. Erythromycin.	9
2.2.1. Discovery and properties.	9
2.2.2. Develop out of resistance.	9
2.2.3. Clinical uses.	10
2.2.4. Precaution and contra-Indications.	10
2.2.5. Interactions with drug and dietary supplements.	11
2.3.1. Discovery and properties of Clarithromycin and Azithromycin.	12
2.3.2. Indication.	13
2.3.4. Drug interactions.	13
2.3.5. Precautions.	14
2.3.6. Comparison between newer Macrolides and Erythromycin.	14
2.4. Immuno modulatory effects of Macrolides.	15
2.4.2. Uses of Macrolides for treatment of diffuse pan bronchiolitis and cystic fibrosis therapy	15

2.5.	From macrolides to ketolides.	16
2.6.	Streptococci species.	16
2.6.1.	History.	16
2.6.2.	Classification.	18
2.6.2.1.	Classification according to haemolysis.	18
2.6.2.2.	Classification by serology.	19
2.6.2.3.	Biochemical and other criteria.	19
2.6.3.	Epidemiology.	19
2.6.4.	Pathogenesis and spectrum of disease.	21
2.6.5.	Metabolism.	22
2.6.6.	<i>Streptococcus pyogenes</i> .	23
2.6.6.1.	Morphology and culture characters.	23
2.6.6.2.	Sensitivity to physical and chemical agents.	23
2.6.6.3.	Biochemical activities and cellular antigen.	23
2.6.7.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .(Laancified group B)	25
2.6.7.1.	Morphology and physiology.	25
2.6.7.2.	Typing, treatment and prevention.	26
2.6.8.	Group D Streptococci (<i>E. faecalis</i>)	26
2.6.9.	<i>Virdans streptococci</i> .	27
2.6.10.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .	28
2.6.10.1.	Morphology and physiology	28
2.6.10.2.	Culture characteristic and biochemical reactions.	28
2.6.10.3.	Treatment and prevention.	29
	Chapter Three: Justification and objectives:	
3.	Justification and objectives	31
3.1.	Justification	31
3.2.	Objectives.	31
3.2.1.	General objective.	31
3.2.2.	Specific objectives.	31
	Chapter Four: Materials and methods	
4.	Materials and methods	32
4.1.	Materials.	32
4.1.1.	Antibiotics.	32
4.1.2.	Reagents.	33
4.1.3.	Equipment and instruments	33
4.1.4.	Biological materials.	33
4.1.5.	Culture media.	37
4.1.5.1.	Blood agar.	33
4.1.5.2.	Mueller-Hinton agar.	34
4.1.5.3.	MacConkey agar.	34
4.1.5.3.	Bile aesculin agar.	34
4.1.5.5.	Trypton soya broth.	34

4.2.	Methods.	35
4.2.1.	Streilization.	35
4.2.2.	Staining techniques.	35
4.2.3.	Collection and culture of specimens.	36
4.2.4.	Examination and preservation of cultures.	36
4.2.5.	Identification of clinical isolates.	36
4.2.5.1.	Primary identification.	36
4.2.5.2.	Secondary identification.	36
4.2.6.	Antibiotic susteptibility testing.	38
4.2.6.1.	Modified Kirby-Bauer disc diffusion test.	38
4.2.6.1.1.	Preparation of media.	38
4.2.6.1.2.	Preparation of turbidity standard equivalent to Mc Farland 0.5.	39
4.2.6.1.3.	Preparation of standard bacterial suspensions (Inoclum).	39
4.2.6.1.4.	Antibiotics discs.	39
4.2.6.1.5.	The procedure.	40
4.2.6.2.	Agar dilution method.	40
4.2.6.2.1.	Preparation of antibiotic diluent phosphate buffer.	41
4.2.6.2.2.	Antimicrobial agents.	41
4.2.6.2.3.	Preparation of stock and working solutions of antimicrobial agents.	41
4.2.6.2.4.	The procedure.	42
	Chapter Five: Results:	
5.	Results:	43
5.1.	Identification of the clinical isolates.	43
5.1.1.	<i>Stryptococcus pyogenes</i> .	43
5.1.2.	<i>Stryptococcus agalactiae</i> .	44
5.1.3.	<i>Viridans streptococci</i> .	44
5.1.4.	<i>Enterococcus faecalis</i> .	44
5.1.5.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .	44
5.2.	Kirby-Bauer disc diffusion method.	44
5.3	Agar dilution method	45
	Chapter Six: Discussion.	
6.	Discussion.	63
	Chapter Seven: Conclusion and recommendations.	
7.	Conclusion and recommendations.	67
7.1.	Conclusion	67
7.2.	Recommendations	67
	References.	69

List of tables

Table 1	Identification of Streptococci	47
Table 2	Interpretation of the inhibition zone diameter and equivalent MIC break points for streptococci and control strains.	48
Table 3	Anti microbial susceptibility showing resistant, intermediate and susceptible strains.	49
Table 4	Antimicrobial zones diameter and equivalent MIC to <i>S. Pyogenes</i>	49
Table 5	Antimicrobial Zones diameter and equivalent MIC to <i>S. agalactiae</i>	50
Table 6	Antimicrobial Zones diameter and equivalent MIC to <i>V. streptococci</i>	50
Table 7	Antimicrobial Zones diameter and equivalent MIC to <i>S. pneumoniae</i>	51
Table 8	Anti Microbial zones diameter and equivalent MIC to <i>Entero coccus faecalis</i>	51

List of plates

Plate No. 1	Culture of <i>Streptococcus pyogenes</i> on blood agar showing sensitivity to bacitracin disc.	52
Plate No. 2	Culture of <i>Viridans streptococci</i> on chocolate blood agar showing alpha- haemolytic colonies resistant to optochin disc.	53
Plate No. 3	Culture of <i>Enterococcus faecalis</i> on bile aesculin agar showing positive aesculin hydrolysis test and litmus milk decolorization test	54
Plate No. 4	Culture of <i>Streptococcus pneumoniae</i> on chocolate blood agar showing alpha-haemolytic colonies sensitive to optochin disc.	55
Plate No. 5	Antibiotic sensitivity test against <i>S. pyogenes</i> using Muller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood.	56
Plate No. 6	Sensitivity test of <i>S. agalactiae</i> on Muller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood.	57
Plate No. 7	Sensitivity test of <i>V. streptococci</i> on Muller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood.	58
Plate No. 8	Antibiotic sensitivity test of <i>Streptococcus pneumoniae</i> on Muller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood.	59
Plate No. 9	Antibiotic sensitivity test of <i>E. faecalis</i> on Muller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood showing resistant to all antibiotics used.	60
Plate No. 10	Sensitivity test of <i>S. Pneumoniae</i> Muller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood showing the largest zone diameter against Clarithromycin.	61

Plate No. 13 MIC on (blood agar mixed with antibiotic) against
Enterococcus faecalis showing growth (resistant) 62