الآيـــــة

قال تعالى:

﴿اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ (١) خَلَقَ الإِنسَانَ مِنْ عَلَقٍ(٢)اقْرَأْ وَرَبُّكَ الأَكْرَمُ(٣)

الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ(٤) عَلَّمَ الإِنسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ(٥)﴾

سورة العلق الآيات: (1-5)

DEDICATION

I dedicate this work to:

My parents

Brothers, Sisters and teachers

ACKNOWLEDGMENT

First of all thanks to ALMIGHTY ALLAH, the greatest and merciful for giving me health and strength to complete this work.

Secondly, I would like to express my appreciation and gratitude to my supervisor Prof. Humodi Ahmed Saeed, for his help, encouragement and guidance throughout the study. Thank you for all the time and efforts you have put in my research.

My thanks and gratitude to Dr. Elhag Mansour, for his suggestion and invaluable help.

My thanks are extended to Mr. Noor aldin M. Ali, head department of General Public Health laboratory, Ministry of Health, Khartoum State. Thanks to all staff members of Microbiology Laboratory in Khartoum Teaching Hospital, Ibtihal Abd allah in Microbiology laboratory, Military Hospital.

Great thanks to my family who had firmly stood behind me, continuously supported the idea and encouraged me during preparation of this dissertation.

Finally, thanks to my colleagues for their fruitful discussion and comments.

ABSTRACT

The objective of the present study was to detect methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolated from clinical specimens in Khartoum State.

A total of 219 of *S. aureus* isolates were collected from microbiology laboratory of Khartoum Teaching Hospital and microbiology laboratory of Military Hospital. The isolates were confirmed as *S. aureus* by phenotypic tests including Gram's stain and other biochemical tests. Modified Kirbry-Bauer disk diffusion method and brain heart vancomycin screen agar were used to detect methicillin and vancomycin resistance strains. Then E-test was applied to confirm vancomycin resistance. DNA was extracted from MRSA and VISA isolates using Muraflux kit. PCR was then performed to amplify *mecA, vanA* and *vanB* genes.

Out of 219 *S. aureus* isolates, 155(70.7%) were found to be methicillin resistant (MRSA), sixteen were vancomycin intermediate (VISA), five strains of them with MIC 8µg/ml and nine strains with MIC 6µg/ml and two strains showed vancomycin MIC of 4µg/ml and thirteen strains of them had shown growth on Brain Heart Infusion (BHI) vancomycin screen agar (vancomycin 6 µg/ml).

Molecular characterization with PCR revealed that among total (155) isolates of MRSA only 137(88.4%) possess *mecA* gene. However, none of VISA strains demonstrated the presence of *vanA* and *vanB* genes.

In conclusion molecular characterization, confirmed the existence of methicillin resistance gene among *S. aureus* isolates, but this finding failed to prove the occurrence of *van* genes-mediated resistance among VISA isolates. Further studies are required to validate this result.

المستخلص

هدفت هذه الدراسة للكشف عن للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للفانكوماسين و الميثيسللين في العزلات السريرية في ولاية الخرطوم.

تم جمع عزلات سريرية من المكورات العنقودية الذهبية من مختبر الاحياء الدقيقة في لمستشفي الخرطوم والسلاح الطبي . و اجريت صبغه الغرام والاختبارات الكيميائيه الحيوية الاخري لتأكيد الهوية التقليديه للبكتيريا،وتم استخدام طريقة كيربي باور الانتشارية لتحديد حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية،وتمت زراعتها ايضا في مستخلص القلب والمخ المحتوي على علي الفانكومايسين (6µg) وفقا لمعايير NCCL, وتم اجراء اختبار (ابسلون) للفانكومايسين لتحديد المثبطة تركيز الحد الادني (MIC) وتم استخراج الحمض النووي الريبوزي (الدنا)من عزلات المكورات العنقودية المقاومة للميثيسللين(155) (بما في ذلك عدد من المكورات العنقوديه المقاومه للفانكوميثين) بواسطة طريقة الميورافلوكس (murflux) ومن ثم تم اجراء اختبار البلمره التسلسلي الجزيئي لتضخيم *vanB,vanA,mecA*.

من مجموع 219 عزله سريريه من المكورات العنقودية الذهبية شكلت المكورات العنقودية المقاومة للميثيللين منها عدد 155 (70.7%)، وشكلت المكورات العنقودية الذهبية متوسطة المقاومة للفانكوماسين عدد 16,(7.3%) عندما تم استخدام طريقه كيربي باور الانتشارية، وعندما تم اجراء اختبار (ابسلون) للفانكومايسين لتحديد المثبطة تركيز الحد الادني (MIC) واكدت وجود (خمس سلالات مع MIC 8µg/ml وتسع سلالات مع MIC 6µg/ml وسلالتين أظهرت فانكومايسين MIC من µg/ml4). كما اكدت من ان عدد (13) من هذه العزلات تنتمي للمكورات العنقوديه الذهبية متوسطة اظهرت نمو علي اجار مستخلص القلب والمخ المحتوي على علي الفانكومايسين (6µg).

واظهرت النتائج ان من مجموع 155عزله من المكورات العنقودية الذهبية المقاومه للميثسللين (ميرزا) كان(137) كانت ايجابيه بنسبة (88.4%). وفي حين انه لم يتم الكشف عن *vanB,vanA في المكورات العنقودية المقاومة للفانكومايسين* .

ختاما دعمت طرق الكشف الجزيئي لنتائج الكشف التقليديه للميرزا وذالك من خلال وجود جينات (*mecA*) في حين انها فشلت في الكشف عن الجينات (*vanA*) و (*vanB*) في عزلات العنقودية الذهبية متوسطة المقاومة للفانكوماسين. يلزم إجراء مزيد من الدراسات للتحقق من صحة هذه النتائج.

TABLE OF CONTENTS

الآيـــــــــــــة……………………………………………………...……………….......I
Dedication……………………….………….……………………………………....II
Acknowledgement………………….……………………………….…………...III
Abstract…………………………….………...…………………………………..…IV
المستخلص………….………………………………….…………………...…….….……....VI
Table of contents………………………………….………………….……………….…VI
List of figures…....…………………………………..……………………………XII

CHAPTER ONE

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

1.1. Introduction…………………………………………………………………...……1
1.2. Rationale…………………………...………………………………………2
1.3. Research Questions………………………………..…………………………….3
1.4.Objectives………………….………………………………………………………3
1.4.1.General Objective……………………………...…………………………………3
1.4.2. Specific Objectives...3

CHAPTER TWO

LITERATURE REVIEW

2.1. History…………………………………………………………………………..….4
2.2. Definition and classification of *Staphylococcus aureus*………………………...........4
2.3. Taxonomy……………………………………………………………………….5

2.4. Normal habitat……..……5

2.5. Morphology and cultural characteristics……...……6

2.6. Cell wall components and antigenic structures…….……6

2.6.1. Cell wall peptidoglycan……..……...6

2.6.2. Teichoic acid…….…….7

2.7. Virulence factors…….……..7

2.7.1. Polysaccharide capsule……...…….7

2.7.2. Protein A……...……7

2.7.3. Extracellular enzymes……...……8

2.7.3.1. Catalase……...……8

2.7.3.2. Coagulase……8

2.7.3.3. Staphylokinase……...…….9

2.7.3.4. Hyaluronidase……..……...9

3.7.3.5. Penicillinase……...…….9

2.7.3.6. Lipase……..……9

2.7.3.7. Nuclease……10

2.7.3.8. Other enzymes……..……10

2.7.4. Toxin production……..…….10

2.7.12.1.1. α-toxin……..……10

2.7.12.1.2. β-toxin……..……11

2.7.12.1.3. δ-toxin……..……11
2.7.12.1.4. γ-toxin and leukocidin……..11
2.7.4.1. Toxic shock syndrome toxin……..……12
2.7.4.2. Enterotoxin…….....12
2.7.4.3. Exfoliative toxin…….……13
2.8. Secretion systems…….……13
2.8.1. Adhesins……..…..13
2.8.2. Invasins…….…….14
2.9. Pathogenesis of *S. aureus* infections……..……..15
2.9.1. Pyogenic infections……16
2.9.2. Toxic mediated infection……..…….17
2.10. Methicillin resistant *S. aureus*……...……18
2.11. Mechanism of methicillin resistance……..……19
2.12. Vancomycin resistant *S. aureus*……..…20
2.13. Laboratory diagnosis of *S. aureus* infection……...……21
2.13.1. Culture…….…….21
2.13.2. Biochemical identification.……..……21
2.13.3. Latex agglutination test……..…….22
2.13.4. Molecular detection…...……..……22
2.14. Treatment of *S. aureus*……...…….23

2.15. Vaccines and new approaches to combatting nosocomial infections……..…24

2.16. Definition of VRSA by Center for Diseases Control and prevention………25

CHAPTER THREE

MATERIALS AND METHODS

3.1. Study design………………………………...………………………..26

3.1.1. Type of study………………………………………………….………26

3.1.2. Study area…………………………………………………………..….26

3.1.3. Study duration………………………………………….……….…..…26

3.2. Bacterial strains……………………………………………………..….26

3.3. Collection of bacterial strains………..…………………………...….26

3.4. Inclusion criteria…………………………………………………..….26

3.5. Exclusion criteria……………………………………………………..26

3.6. Phenotypic characterization of isolates………………………...…….26

3.6.1. Purification of bacterial strain……………………………….....…….26

3.6.2. Colonial morphology…………………………...……………………..27

3.6.3. Gram's stain…………………………………………………...…27

3.7. Biochemical identfication……...………………...…………………………...27

3.7.1. Catalase test…………………………………………………...…27

3.7.2. Coagulase test……………………………………………………..….27

3.8. Preservation of isolates ………………………………………………....27

3.9. Antibiotics susceptibility test…….…………………….………………28

3.10. E-test……………………………..……...…………………..…28

3.11. Brain heart infusion vancomycin screen agar…..……………………..…28

3.12. Genotypic characterization…………………………………………….29

3.12.1. DNA extraction……………………………...……………………29

3.12.2. Measurements of DNA concentration……….. ……………………….29

3.12.3. Polymerase chain reaction (PCR)……………………………………....29

3.12.3.1. Primers…………………………………………………...……...29

3.12.3.2. preparation of reaction mixture of *mecA*, *vanA* and *vanB* genes………..30

3.12.3.3. PCR amplification……………………………………………...….31

3.12.3.3.1. PCR program used for amplification of *mecA* gene…………………..31

3.12.3.3.2. PCR program used for amplification of *vanA* gene………………..…31

3.12.3.3.3. PCR program used for amplification of *vanB* gene……………...……31

3.12.4. Agarose gel preparation and analysis …………………………...…….32

3.12.5. Interpretation of PCR results…………………………..………………32

CHAPTER FOUR

4. RESULTS

4. Results……33

CHAPTER FIVE

DISCUSSION

5.1. Discussion……38

5.2. Conclusion……..……..41

5.3. Recommendations……41

References……...……42

Appendices……..49

LIST OF FIGURES

Figure 1. Growth of VISA (6µg/l) on vancomycin E.Test on Muller-Hinton agar.....34

Figure 2. PCR products of *mec* A gene resolved onto 1.5% agarose gel electrophoresis35

Figure 3. PCR products of *van* A gene positive control resolved onto 1.5% agarose gel electrophoresis……...36

Figure 4. PCR products of *van* B gene positive control resolved onto 1.5% agarose gel electrophoresis……...37