Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Microbiology
Name: Heba Badr Mahmoud Mahmoud
Date of birth: 26/02/1982 **place of birth:** El-Masara-Helwan
Nationality: Egyptian **Bacteriology, Immunology, Mycology**
Title of thesis: "Microbiological studies on *Staphylococcus aureus* with regard to antibiotic resistance"
Under Supervisors of: Prof. Dr. Mona I. H. El-Enbaawy
Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University.
Prof. Dr. Soad Abd El-Aziz Abd El-Wanis
Chief researcher of poultry Diseases, Technical manger in central laboratory for quality control on poultry production.

Abstract

A total of 296 samples examined bacteriologically for ***Staphylococcus aureus*****,** 59 samples were positive for coagulase positive ***S.aureus***, with a total prevalence of 19.9 %. The prevalence among diseased chickens was 16.7 % While, 18.8%, 26.7 %, 12 %, 19.7 % of broiler farms, layer farms, Giza abattoirs and imported frozen chickens were positive, respectively. The high percentage of coagulase positive ***S.aureus*** from diseased chickens was isolated from joint (35.7 %) while, no positive results were found from abscesses and eggs samples. The isolated strains of coagulase positive ***S.aureus*** were tested for antimicrobial sensitivity. Most strains were resistant to penicillin and ampicillin, less resistance was appeared to amoxicillin, oxacillin, bacitracin, ceftrixone, methicillin, cephalothin and amoxicillin clavulinic acid, while all strains were sensitive to vancomycin. On the other hands ceftrixone, bacitracin and methicillin showed intermediate sensitivity with the percentage of 40.7%, 25.4% and 20.3%, respectively. All isolated strains of coagulase positive ***S.aureus*** were examined for the β-lactamase production, 67.8 % were positive revealed from 54.5 %, 61.5 %, 70 %, 33.3 % and 91.7 % from diseased chickens, broiler farms, layer farms, Giza abattoirs and imported frozen chickens, respectively. Using PCR technique, amplification of 310 bp fragment of *mecA* gene from the extracted DNA of coagulase positive ***S. aureus*** isolates of different chicken samples and related human resulted in PCR product in the percent of 10.2% (6/59); 15.4 % (2/13) of broiler farms, 15 % (3/20) of layer farms and 8.3 % (1/15) of imported frozen chickens were positive, while coagulase positive ***S.aureus*** isolated from diseased chickens and Giza abattoirs samples were negative for *mecA* gene. Regarding to the relation between the multidrug resistan, β-lactamase production and presence of *mecA* gene on coagulase positive ***S.aureus*** strains. The incidence of multidrug resistant ***S.aureus*** strains from human (13/14; 92.9%) was higher than that of poultry (29/45; 64.4%). The incidence of positive β-lactamase producing ***S.aureus*** strains from poultry (32/45; 71.1%) was higher than that of human (8/14; 57.1%), While, the incidence of positive *mecA* gene from human was higher (3/14; 21.4 %) than that of poultry (3/45; 6.7 %).

جامعة القاهرة
كلية الطب البيطرى
قسم الميكروبيولوجيا

مستخلص عربى

الاسم: ط. ب. / هبه بدر محمود محمود
تاريخ الميلاد: ١٩٨٢/٠٢/٢٦ **جهة الميلاد:** المعصرة- حلوان
الجنسية: مصرية **الدرجة:** ماجستير
التخصص: بكتريولوجي وفطريات ومناعة

عنوان الرسالة: **"دراسات ميكروبيولوجية عن ميكروب المكور العنقودى (ستاف اوريس) مع النظر الى المقاومة للمضادات الحيوية"**

تحت اشراف: **أ. د/ منى ابراهيم حسن الانبعاوى**
أستاذ الميكروبيولوجيا، كلية الطب البيطرى جامعة القاهرة٠

أ. د/ سعاد عبد العزيز عبد الونيس
رئيس بحوث الدواجن والمدير الفنى بالمعمل القومى للرقابة البيطرية على الانتاج الداجنى٠

من الفحص البكتيرى لعدد ٢٩٦ عينة من أجل عزل الميكروب العنقودى الذهبى كانت ٥٩ عينة ايجابية التجلط للميكروب العنقودي الذهبي بنسبة ١٩,٩ % وهذه النسبة الايجابية كانت ممثلة فى ١٦,٧ % من الدجاج المصاب بينما ١٨,٨، ٢٦,٧ %، ١٢ % و ١٩,٧ % من مزارع التسمين، مزارع البياض، مجازر الجيزة و الدجاج المجمد المستورد علي الترتيب. وجد أن أعلى نسبة ايجابية التجلط للميكروب العنقودي الذهبي فى الدجاج المصاب كانت من المفاصل (٣٥,٧ %) بينما لم يتم عزل الميكروب من عينات الدمامل والبيض. وقد تم عمل اختبار الحساسية للعينات المعزولة ايجابية التجلط للميكروب العنقودي الذهبي. ووجد أن معظم المعزولات كانت مقاومة الى البنيسيللين و الامبيسيللين وأقل مقاومة كانت ظاهرة للاموكساسيللين، اوكساسيللين، باستراسين، سيفاتركسون واموكساسيللين + كلافيولينك اسيد بينما كل المعزولات كانت حساسة الى الفانكوميسين. على الوجه الاخر اظهرت المعزولات مقاومة متوسطة لكلا من سيفاتركسون، باستراسين و ميسيسيللين بنسبة ٤٠,٧ %، ٢٥,٤ % و ٢٠,٣ % بالترتيب. كل المعزولات ايجابية التجلط للميكروب العنقودي الذهبي وقد تم اختبار انتاج انزيم البيتالاكتيماز ووجد ٦٧,٨ % من العينات ايجابية والتى نتجت عن ٥٤,٥ %، ٦١,٥ %، ٧٠ %، ٣٣,٣ % و ٩١,٧ % من الدجاج المصاب، مزارع التسمين، مزارع البياض، مجازر الجيزة و الدجاج المجمد المستورد علي الترتيب. باستخدام الـ PCR تم زيادة جزء من جين *mecA* وزنه الجزائى ٣١٠ bp بعد استخلاص الحامض النووى من العينات الايجابية التجلط للميكروب العنقودي الذهبي المعزولة من عينات الدجاج المختلفة والعاملين المخالطين لها. نتج عن الـ PCR ١٠,٢ % (٩٥/٦) عينة ايجابية من ١٥,٤ % (٣/٢) من مزارع التسمين، ١٥ % (٢٠/٣) من مزارع البياض و ٨,٣ % (١٥/١) من الدجاج المجمد المستورد بينما العينات ايجابية التجلط للميكروب العنقودي الذهبي المعزولة من الدجاج المصاب و مجازر الجيزة كانت لا تحتوى على جين *mecA*. بالاشارة الى العلاقة بين المقاومة ضد ٣ او أكثر من مضادات حيوية وأنتاج انزيم البيتالاكتيماز ووجود جين *mecA* فى العينات ايجابية التجلط للميكروب العنقودي الذهبي. وجد أن حدوث المقامة المقاومة ضد ٣ او أكثر من مضادات حيوية للمعزولات من الانسان (١٤/١٣؛ 92.9 %) والتى كانت أعلى من المعزولات من الدجاج (٢٩/ ٤٥؛ ٦٤,٤ %). ووجود عينات ايجابية أنتاج البيتالاكتيماز بين المعزولات من الانسان (١٤/٨؛ ٥٧,١ %). بينما وجود عينات ايجابية لجين *mecA* من الانسان (١٤/٣؛ ٢١,٤ %) كانت أعلى من الدجاج (٤٥/٣؛ ٦,٧ %).

List of contents

Title	Page No.
1- Introduction.	1 - 4
2- Review of Literature.	5–51
2.1- ***Staphylococcus aureus*** in poultry and human.	5
2-2 Methicillin resistance ***Staphylococcus aureus:***	24
2-3 β-lactamase production by ***Staphylococcus aureus***.	30
2-4 Resistance gene (*mecA*) among ***S. aureus***.	34
3- Materials and Methods.	52–76
3-1 Materials.	52-62
3-1-1 Samples**.**	52
3-1-2 Material used for ***Staphylococcus*** isolation and identification.	
3-1-2-1 Media:-	54-59
3-1-2-1-1 Media used for isolation and preservation of ***Staphylococci****.*	54-58
3-1-2-1-2 Media used for biochemical identification of ***Staphylococcus aureus***.	58
3-1-2-1-3 Media used for antimicrobial sensitivity testing of ***Staphylococcus aureus*** isolates.	59
3-1-2-2 Reagents and kits.	60
3-1-2-3 Gram's staining.	61
3-1-2-4 Antimicrobial discs.	61
3-1-2-5 β-LACTA strip.	61
3-1-2-6 *S.aureus* reference strains.	62
3-1-2-7Materials used for ***staphylococc***i isolation and identification.	63

List of contents

Title	Page No.
3-1-3 Materials used for PCR technique.	64-66
3-1-3-1 Oligonucleotide primer.	64
3-1-3-2 Materials used for agrose gel electrophoresis (buffer and reagents).	64
3-1-3-2-1 Agarose powder.	64
3-1-3-2-2 Ethedium bromide solution 10mg/ml.	64
3-1-3-2-3 Tris Boric EDTA (TBE) electrophoresis buffer (10 x stock).	65
3-1-3-2-4 Molecular weight marker.	65
3-1-3-2-5 PCR Master Mix (2x Brilliant QPCR master mix).	65
3-1-3-2-6 materials used for PCR method.	66
3-2 Methods.	67-76
3-2-1 Samples.	67
3-2-2 Isolation of ***Staphylococcus aureus***.	68
3-2-3 Biochemical tests and characteristic features for identification of ***S.aureus*** and other species of ***Staphylococci.***	69
3-2-4 Antimicrobial sensitivity test.	72
3-2-5 Detection of β-lactamase production.	73
3-2-6 Extraction of ***Staphylococcus aureus*** DNA by boiling method.	74
3-2-7 Amplification of *mecA* gene from DNA of ***Staphylococcus aureus*** isolates.	75
3-2-8 Agarose gel electrophoresis.	75

List of contents

Title	Page No.
4- Results	77 - 113
5- Discussion	114 - 141
6- Summary	142 - 144
7- References	145-175
8-Arabic summary	1-٣

Abbreviations

ABPC	Ampicillin
AMC	Amoxicillin clavulanic acid
AR	Antibiotic resistance
BCO	Bacterial chondronecrosis with ostemyelitis
BHIB	Brain heart infusion broth
bp	Base pair
BPW	Buffer peptone water
BRSA	borderline-resistant ***S. aureus***
bDNA	branched DNA
BP	Baird Parker's agar medium
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEZ	Cefazolin
CHEF	Contour-clamped homogeneous electric field
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNA	Columbia nalidixic acid agar
CNS	Coagulase-negative ***Staphylococci***
CoPS	Coagulase positive ***Staphylococcus aureus***
C.S	Cloacal swabs
D.W	Distilled water
D.S	Drag swabs
EM	Erythromycin
ET	Exfoliatin toxin
EMRSA	Epidemic methicillin resistant ***S.aureus***
GM	Gentamycin
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
IBD	Infectious bursal disease
KM	Kanamycin
KZN	KwaZulu-Natal
MIC	Minimal inhibitory concentration
MIC	Microdilution
MLST	Multilocus sequencing typing
MRSA	Methicillin resistance ***Staphylococcus aureus***
MSA	Mannitol salt agar
MSLA	MRSA screen latex agglutination
MSSA	Methicillin-susceptible ***S. aureus***
NNIS	National Nosocomial Infection Surveillance

ODD	Oxacillin disk agar diffusion
OSS	Oxacillin screening salt agar
PBP	Penicillin Binding Protein
PCG	Benzylepenicillin
PCR	Polymerase chain reaction
PEA	Phenyl ethyl alcohol agar
PFD	Proximal femoral degeneration
PFGE	Pulsefield-gelelectrophoresis
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
SCCmec	*Staphylococcal* cassette chromosome *mec*
SDS	Sodium dodecyl sulfate gel
SEA-G	***Staphylococci*** enterotoxin A,B,C,D,E and G
SHS	Swollen head syndrome
SmMSSA	Silent *mecA*-carrying methicillin susceptible ***S.aureus***
TBC	Total bacterial counts
TBE	Tris Boric EDTA
T.S	Tracheal swabs
TSA	Tryptic soya agar
TSST	Toxic shock syndrome toxin
USA	United State of America
UK	United Kingdom
UV	Ultra violet
UVH	University veterinary hospital