

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
قال تعالى

اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ (١)
خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ (٢) اقْرَأْ
وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ (٣) الَّذِي عَلَّمَ
بِالْقَلَمِ (٤) عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ
يَعْلَمْ (٥)

صدق الله العظيم

سورة العلق الآية 1-5

Dedication

I dedicate this research to

My kind father.....

My kind mother.....

Who taught me how I could be humanate

My sisters.....

And my fiancés family

For their support and kindness

My friends and my colleagues.....

The persons whom I love, respect and
appreciate.....

& every one from whom I learned...

Acknowledgments

First of all, thanks for Allah Almighty who gave me the power for preparation and completion of this study.

I would like to express the deepest appreciation to my supervisor **Dr. Mogahid Mohammed El Hassan** Head of Microbiology Department College of Medical Laboratory Science, Sudan University of Science and Technology for his advice, enthusiasm, help and endless support.

My deep thanks are extended to Dr. **Misk Elyaman Abdela'ati** for her help and encouragement.

And special thanks to **Dr. Adel Mahjoub** University of Khartoum who gave us large support to finish mycolic acids method.

Also I would like to thank the staff of Sudan University of Science and Technology, especially research laboratory senior technician **Miss. Suheir Ramdan** who helped me to find equipments in the lab to complete my practical.

I would like to send special thanks to my colleague **Miss Eman Osman** from National Tuberculosis Reference laboratory who gave us a lot of help and without her we couldn't finish our work.

Also special thanks to the staff members of National Tuberculosis Reference Laboratory for their help and support.

Finally thanks for my friends and my colleagues.

ABSTRACT

This study aimed to detect the frequency of non tuberculous mycobacteria among tuberculous patients in Khartoum state by conventional and molecular methods.

This study is a cross-sectional laboratory-based study in which sputum samples were collected from patients attending Abu-Anga Teaching Hospital, El Shaab Teaching Hospital and the Tuberculosis Reference Laboratory at the national Health Laboratory in Khartoum, Sudan, during the period from January to March 2010. Patients were consented and informed. Sputum samples that showed AFB-positive results were included.

Two tubes of the Lowenstein-Jensen medium were inoculated with 20µl of the neutralized sputum sample that was obtained from the patients and decontaminated. One of the tube contained pyruvic acid to isolate *Mycobacterium bovis* if encountered.

All sputum samples were inoculated and in LJ media, 40 (23.4%) showed MTC-like colonies, 10 (5.8%) were considered rapidly growing mycobacteria, 2(1.2%) showed contamination and 119 (69.6%) no growth. The recover rapidly growing colonies were identified by conventional methods. Out of the 10 rapidly growing, 4 (2.3%) of the isolates were non tuberculosis mycobacteria organisms which were identified by conventional methods and PCR.

The biochemical tests regarding the NTM isolates showed that 4 out of 4 (100%) were sensitive for Para-nitrobenzoic acid (growth was inhibited by PNB); 4 out of 4 (100%) were resistant to Thiophene – 2 – Carboxylic Acid Hydrazide TCH; 2 out of 4(50%) were positive for nitrate reduction, all the 4 isolates

were negative for catalase test at 68°C while 3 out of 4 (75%) were catalase positive at room temperature. Three out of the four isolates (75%) showed the standard patterns of mycolic acid components when thin layer chromatographic technique was used. Then the result of the conventional methods was confirmed by PCR.

When the one hundred and forty five Mycobacterial isolates were subjected to PCR. Four isolates showed a band typical in size (136 bp) to the target gene (*rpoB*) of NTM as indicated by the standard DNA marker. The rest one hundred and forty one showed a band typical in size (123 bp) to the target gene (IS6110) of MTB as indicated by the standard DNA marker.

These results revealed a prevalence of (4,2.3%) isolates having phenotypic properties typical for members of the genus *Non Tuberculosis Mycobacteria*, and revealed clearly the importance of conventional methods and PCR technique in the diagnosis of pulmonary patients especially if there is other invader of non tuberculosis mycobacteria.

ملخص الأطروحة

هدفت هذه الدراسة للكشف عن تردد المتفطرة الغير سلية بين مرضي السل الرئوي في ولاية الخرطوم عن طريق الاساليب التقليدية وتفاعل البلمرة التسلسلي .

هذه الدراسة عبارة عن دراسة معملية شاملة للقطاعات, تم جمع عينات التفاف لمرضى حضروا لمستشفى أبو عنجة التعليمي, مستشفى الشعب التعليمي, والمعمل المرجعي للدرن بالخرطوم, السودان, في الفترة من يناير إلى مارس 2010. تم تنوير المرضى بالبحث وأخذ موافقتهم, جميع عينات التفاف المائة وواحد وسبعون المتضمنة في البحث أظهرت نتيجة موجبة لصبغة العصبوبات المقاومة للأحماض.

تم تزرع عينات التفاف في أنبوبين من وسط ليئوستين جنسين بعد إزالة التلوث منها. واحد من الأنبوبين يحتوي على حامض البايروفيك لعزل المنفطرة البقريّة إن وجدت.

كل عينات التفاف تم تزيّعها وسط ليونيسيّتين جنسن, 23.4% أظهرت مستعمرات تشبه عضيات الباكترية المتفطرة الدرنية, 5.8% اعتبرت متفطرة سريعة النمو و 70.8% من العينات أظهرت تلوث. ولم تنمو المستعمرات التي تشبه المتفطرة الغير درنية تم تأكيدها بواسطة الطرق التقليدية.

من أصل 10 عزلات التي نمت بسرعة, 4 (2.3%) من العزلات كانت متفطرة غير سلية و قد تم تحديدها وتأكيدتها بواسطة الأساليب التقليدية وتفاعل البلمرة التسلسلي.

من جملة مائة وواحد وسبعين عينة, 4 (2.3%) من العينات المعزولة كانت من عصيات الباكترية المتفطرة غير الدرنية. الاختبارات الكيموحيوية لهذه العزلات أظهرت ان 4 عينات من اصل 4 (100%) كانت حساسة لإختبار حمض البارانايتروبنزويك (الحمض يمنع نمو الباكترية), 4 من اصل 4 عينات (100%)

كانت مضادة لإختبار الثيوفين - 2 - كاربوكسيلك اسيد هيدرازيد, 2 من اصل 4 عينات (50%) كانت موجبة لإختبار إختزال النترات و 4 من اصل 4 (100%) من بينما 3 من 68 °C العينات المعزولة كانت سالبة لإختبار الكاتاليز في درجة حرارة 4 من العينات (75%) كانت موجبة لاختبار الكاتاليز في درجة حرارة الغرفة. وثلاثة من اصل اربعة عينات (75%) أظهرت الخصائص المعيارية لحمض المايكولييك عند استخدام طبقة رقيقة من تقنية الكروماتوغرافي.

تم تأكيد نتائج الاساليب التقليدية عن طريق تقنية الاحياء الجزيئية حيث تم اختبار مائة وخمسة واربعين عزلة من عصيات الباكثيريا المتفطرة الدرنية والغير درنية بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي. 4 (2.3%) من العينات المتفطرة الغير درنية زوج قاعدي (136) $lrp0B$ أظهرت حزمة مطابقة في القياس للجين المستهدف بينما مائة وواحد واربعين (97.2%) عزلة من المتفطرة الدرنية أظهرت حزمة زوج قاعدي (كما هو مشار 123) $IS6110$ مطابقة في القياس للجين المستهدف إليه بواسطة المؤشر القياسي للحامض النووي الرايبوزي منزوع الأوكسجين.

هذه النتائج أظهرت 4 من العزلات وهي تمثل نسبة تردد (2.3 %) من أعضاء المقرحة جنس آخر غير السلية والتي وجدت لديها نفس الخصائص المظهرية النموذجية. وايضا كشفت هذه الدراسة بوضوح أهمية الطرق التقليدية التي تشمل تقنيات صبغة زيهل نيلسن والتزريع في تشخيص الدرن خصوصا إذا اشتبه في ان . مسبب العدوي الصدرية هي باكتيريا اخري مثل المتفطرات غير المتفطرة الدرنية

Table of Contents

الآية	I
Dedication	II
Acknowledgment	III
Abstract (English)	V
Abstract (Arabic)	VII
Table of Contents	IX
List of Figures	XIV
1. CHAPTER ONE: Introduction and Objectives	1
1.1 Introduction	1
1.2 Rationale	3
1.3 Objectives	4
2. Chapter TWO: LITERATURE REVIEW	5
2.1 Non Tuberculosis Mycobacteria	5
2.1.1 Taxonomy of Mycobacterium	5

2.1.2 Epidemiology	6
2.1.2.1 Epidemiology of TB in Sudan	7
2.1.3 Microscopic morphology	8
2.1.4 Distribution in the environment	9
2.1.5 Diseases caused by NTM	10
2.1.5.1 Pulmonary infection	10
2.1.5.2 Skin disease	12
2.1.5.3 Lymphadenitis	12
2.1.5.4 Disseminated disease	13
2.1.6 Natural reservoirs	13
2.1.7 Pathogenesis and host defense	14
2.1.8 Diagnosis of NTM disease	17
2.1.8.1 Clinical diagnosis	17
2.1.8.2 Immunological tests	18
2.1.8.3 Conventional microbiological diagnosis	19
2.1.8.3.1 Acid fast staining	19
2.1.8.3.2 Culture	20
2.1.8.3.4 Species identification	22
2.1.8.4 Molecular identification of NTM species	22
2.1.9. treatment of NTM	24
3. CHAPTER THREE: MATERIALS AND METHODS	26
3.1 Study Design	26
3.1.1. Type of The Study	26

3.1.2. Study Area	26
3.1.3. Study Population	26
3.1.4. Data Collection	26
3.2 Asepsis and sterilization	26
3.2.1 Flaming	26
3.2.2 Red Heat	27
3.2.3 Hot air oven	27
3.2.4 Moist Heat (autoclaving)	27
3.2.5 Disinfection	27
3.3 Method of sample collection	27
3.4 Ziehl Neelsen stain	28
3.4.1 Sputum smear preparation	28
3.4.2 Acid fast staining procedure	28
3.5 Decontamination of sputum	29
3.6 Preparation of LJ medium	29
3.7 culture method	30
3.8 Identification of isolate	30
3.8.1 Growth rate	30
3.8.2 Pigment production	30
3.9 Catalase test	31
3.10 Nitrate reduction test	31
3.11 Sensitivity to Para – Nitrobenzoic Acid (PNB) 500 mg / L	31
3.12 Sensitivity to Thiophene- 2 -Carboxylic Acid Hydrozide (TCH) 5Mg / L	31
3.13 Analysis of mycolic acid	32

3.14 Molecular identification	32
3.14.1 Genomic DNA extraction and amplification of genes	32
3.14.2 PCR	33
3.14.2.1 Preparation of PCR master mix	33
3.14.2.2 PCR amplification	33
3.14.3 Preparation of Agarose gel	34
3.14.4 Visualization of PCR product	34
3.14.5 Interpretation of PCR result	34
4.CHAPTER FOUR: RESULTS	35
4.1 Epidemiological findings	35
4.1.1 Gender	35
4.1.2 Age group	35
4.2 Bacteriological result	39
4.2.1 Direct Z.N stain	39
4.2.2 Isolation	39
4.2.3 Growth rate	39
4.2.4 Identification	39
4.2.4.1 Cultural Characteristic	39
4.2.4.2 Indirect Z.N stain	40
4.2.4.3 Biochemical tests	40
4.2.5 Mycolic Acid	40
4.2.6 Polymerase Chain Reaction	40

Amplification of the target genes 4.2.6.1	40
CHAPTER FIVE: DISCUSSION	46
CHAPTER SIX: Conclusion and Recommendations	48
References	50
Appendices	65
Appendix 1 Z.N staining	65
Appendix 2 Decontamination of sputum	66
Appendix 3 Preparation of LJ medium	67
Appendix 4 Catalase test	68
Appendix 5 Nitrate reduction test	69
Appendix 6 Sensitivity to PNB	70
Appendix 7 Sensitivity to TCH	70
Appendix 8 Table of biochemical results	71
Appendix 9 Questionnaire	72

List of Figures

Figure (1) Distribution of pulmonary infection according to gender	36
Figure (2) Distribution of pulmonary tuberculosis patients according to age	37
Figure (3) Shows pulmonary infection among different age group	38
Showed characteristic growth of NTM on LJ medium Figure (4)	41
Figure (5) Sensitivity to PNB	42
Figure (6) Resistance to TCH	42
Figure (7) Result of Nitrate Reduction test	43
Figure (8) Result of Mycolic Acid profile	44

Figure (9) Result of PCR (DNA amplification)	45
--	----