الآيـــــة

(رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ

وَعَلَى وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحاً تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي

بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ }

صدق الله العظيم

سورة النمل ، الآية (19)

I would like to dedicate this research

to all those who always have been there

for me.

To to the souls of my Father and mother

To my wife and son..

With much love ….

Isam

Acknowledgments

My greatest depth of gratitude must go to the Staff College of Graduates Studies, of them I would like to thank my supervisor, Dr. Mogahid Mohamed El Hassan who saved me from insensitivities and obscurities of research by his firm guidance and superior standing and knowledge.

My thanks are extended to my colleagues for their kind support and their beautiful friendship.

I would also like to thank my old and little family for their patience and support.

Abstract

The spread of multidrug-resistant (MDR) strains of *Mycobacterium tuberculosis* has become a major public health concern since these bacteria often cause incurable disease, even when expensive second- and third-line drugs are available.

This study aimed to identify *M. tuberculosis* among suspected tuberculous patients in Khartoum and Gazeera States by using conventional methods also to identify rifampicin resistance *M. tuberculosis* by amplifying rpoB gene, using polymerase chain reaction (PCR). Moreover, it aimed to detect *M. tuberculosis* from direct sputum by PCR.

Out of 228 of sputum samples, 128 and 100 were collected from suspected tuberculosis patients in Khartoum and Gezeera states respectively. Smears were made stained directly using Ziehl-Neelsen (ZN) stain. The results showed that, among Khartuom state suspected patients, 36 (21.7%) were positive for acid fast bacilli (AFB) while 92 (78.3) were negative, and among Gazeera state suspected patients 23(23%) were positive while 77 (77%) were negative. All sputum samples from Khartuom were inoculated on Lowenstein Jensen (LJ) medium and incubated aerobically at 37°C,the isolates showed obvious growth in 46 (36%) whereas 82 (64%) showed no growth, while samples from Gazeera were suspected to direct to PCR.

Selected biochemical tests were performed to all *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) isolates of Khartuom state, the results revealed that all isolates were sensitive to Para-nitro benzoic acid (growth was inhibited by PNB), resistant to thiophene - 2 - carboxylic acid

hydrazide (TCH), positive for nitrate reduction and were catalase negative at 68°C.

All the forty six isolates that showed typical growth of MTC on LJ medium were subjected to PCR to amplify IS *6110* gene .The results indicate clearly that all isolates showed 123bp bands for IS6110 gene, Drug sensitivity tests were performed to all isolates, the results showed that 26(20.3%) as MDR-TB, 16 (34.8%) as sensitive to rifampicin, Isoniazid, Ethambutol and streptomycin, 2 (4.4%) as resistance to streptomycin, and 2(4.4%) as triple resistance to Isoniazid, Ethambutol and streptomycin.

The twenty six resistant isolates were subjected to PCR searching for rifampicin resistance gene (rpoB) with band equal to 193bp in size, the results showed existence of this band in 20.3% of the mycobacterium tuberculosis isolates, of them 86.7% had resistance to rpoB gene.

Regarding Gazeera state, out of 74 isolates the resistant strains were 25 (33%) only 19 (19%) gave band typical in size to the target gene rpoB (193bp) as indicated by standard DNA ladder for the present of rifampicin resistant gene, of them 76% had resistance to rpoB gene.

Due to the low sensitivity of ZN technique and the long time required to conduct drug susceptibility test (DST) through conventional method, the results concluded the PCR is a valuable, rapid and sensitive technique which can replace conventional method, and PCR is also useful when taken directly from sputum.

The study recommended that, PCR assay could be introduced as a diagnostic tool for tuberculosis, and recommended to support the development of new tools and enable their timely and effective use.

مستخلص الرسالة

بات انتشار المنفطرة السلية متعددة المقاومة للادوية من الشواغل الرئيسية للصحة العامة، حيث ان هذه البكتريا غالبا ما تسبب مرض عضال, حتى بتوفر الادوية البديلة باهظة التمن.

هدفت هذه الدراسة للتعرف علي المنفطرة السلية بين المرضي المشتبه إصابتهم بالسل في كل من ولاية الخرطوم و ولاية الجزيرة ، باستخدام الطرق التقليديـــة، والتعـــرف علـــي الجين(rpoB) المقاوم للمضاد ريفامبيسينبين السل متعدد المقاومه للادويه باستخدام تفاعـــل البلمرة التسلسلي والدي استخدم أيضاً لعزل المنفطرة السلية مباشرة من الخشعة كهدف اخر.

من بين 228 عينة خشعة من المرضى المشتبه إصابتهم بمرض السل تم جمع عدد مئة وثمان وعشرون عينة من الخرطوم ومائة مـــن الجزيـــرة. تم على اختبار الصحة المباشر باستعمال صبغة ZN. أظهرت النتائج أنـه من بين عينـات ولايـة الخرطـوم36 (21%) كانـت موجبه للعصيات المقاومة للاحماض، بينما 92 (78.3%) كانت سالبة. ولدى ولاية الجزيـــرة 23(23%) كانت موجبه للعصيات المقاومه للاحماض بينما 77 (77%) كانت سالبه.

فيما يخص المجموعة ولاية الخرطوم 46 (36 ٪) كانت نتائج موجبة لتزريع المنفطرة السلبية في وسط ليونيستين جنسن عند درجه حرارة37°C و82 (64 ٪) اظهرت نتائج سالبة. وقد خضعت العينات من ولايه الجزيرة مباشرة لتفاعل البلمرة التسلسلي.

العينات الموجبة للتزريع خضعت للاختبارات البيوكميائية و اظهرت حساسية بنسبة (100٪) لحامض البرانايتروبنزويك (تم تثبيط النمو بواسطة حامض البرانايتروبنزويك)، مقاومة للتيوفين 2- حمض كاربوكسيليك اسيد هيدرازيد ، موجبه لاختبار اختزال النترات وكانت سلبية لاختبار الكتاليزفي درجة حرارة 68 °م.

اظهرت اختبارات الحساسية للادوية بان 26 (20.3 ٪) منفطرة سليه, متعددة المقاومة للادوية ، 16 (34.8 ٪) سلالة حساسة للنوع الاول من لادوية, سلالتين (4.4 ٪) مقاومة فقط للستربتومايسين ، وسلالتين ثلاثية المقاومة للايزونيزايد, الستربتوميسين و الإيتامبوتول.

ستة واربعون (36 ٪) من عزل المنفطرة السلية اختبرت بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي. (100٪) من العزلات اظهرت حزمه مطابقه في القياس (123 bp) للجين المستهدف (*IS 6110*). ستة وعشرون من عزلات المنفطرة السلية المقاومه للادويه اختبرت بواسطه تفاعل البلمرة التسلسلي للجين المقاوم للرفامبسين، اظهرت حزمه مطابقه في القياس(193bp) بنسبة(20.3٪، كانت من بينهم (86.7%) مقاومة للـــجين (rpoB).

اما فيما يخص المجموعة ولاية الجزيرة فخمسة وعشرون (25%) من عزلات المنفطرة السلية المقاومة للادوية اختبرت بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي للجين المقاوم للرفامبسين وكانت موجبة، بينما تسعة عشر (19%) اظهرت حزمة مطابقة في القياس(193bp) بنسبة (19٪) كانت من بينهم (76%) مقاومة للـــجين (rpoB).

نتيجه لانخفاض حساسيه الصبغه المقاومه للاحماض، الفترة الطويله المستغرقه لاداء التزريع واختبار الحساسية للادوية، اظهرت النتائج بوضوح اهمية، وحساسية، وجدوى تفاعل البلمرة التسلسلي كاداة سريعة للتشخيص والكشف عن المتفطرة السلبية وللجين المقاوم للرفامبسين. كما انه يمكن استخدام تفاعل البلمرة التسلسلي مباشرة من الحشعة المريض.

اوصت الدراسشة بضرورة اعتبار تفاعل البلمرة التسلسلي كاداة تسخيصية لمرض السل، كما اوصت بدعم وتطوير وسائل التشخيص الحديثة وتقييم نتائجها السريعة والدقيقة.

LIST OF CONTENTS

List of Figures

List of Tables