بِسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قال الله تعالى

وَاللَّهُ أَخْرَجَكُمْ مِنْ بُطُونِ أُمَّهَاتِكُمْ لَا تَعْلَمُونَ شَيْئًا وَجَعَلَ لَكُمُ السَّمْعَ وَالْأَبْصَارَ وَالْأَفْئِدَةَ لَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ

صدق الله العظيم

سورة النحل الآية 78

Dedication

I dedicate this research to:

My Kind Mother and to the Soul of My Father

My Dear Wife

My brothers and sisters

My friends and my colleagues

All who has ever taught me any thing

All Sudanese TB Patients

Acknowledgements

Most of all my thanks and praise to Allah who blessed me, and gave me the health, patience, and the will to achieve this project.
A special appreciation and gratitude to my supervisor Dr. Mogahid M El hassan for his follow up and invaluable advisements that extended from the proposal of this work, through its practical and up to the final touches of the thesis.
I need to thank my co-supervisor Dr. Mohammed E. Hamid (College of Medicine, King Khalid University, Abha KSA) for his valuable directions and un-limited support through all the stages of this project.
My thanks and gratitude are also extended to the staff members of Kassala Teaching Hospital, Kuwaiti Paediatric Hospital, Khashm El Girba Hospital, Aroma Hospital, and Wagar Hospital. Phatou Primary Health Care Center and Western Elgash Primary Health Care Center.
My thanks and gratitude are also extended to the staff members of the Faculty of Medicine and Health Sciences specially Dr. Fatma Abbas Khalid, director of TB.R.C. University of Kassala.
In this respect I would like to express my appreciation and gratitude to all of the staff members of Tuberculosis Reference Laboratory specially Miss. Eman Osman, Dr. Nuha Yousif Ibrahim and Mr. Majdi Yahia for their integration and help.
I am particularly grateful to all of the staff members of Research Laboratory, College of Medical Laboratory Science, Sudan University of Science and Technology, specially Miss Suhaer Ramadan Rehan for her help and respect.
Also, I would like to express my gratitude to Mr. Ahmed Lauy and Mrs. Maimona A El Emam for their great help.
Great thanks to the Dean and colleagues at the College of Medical Laboratory Science, Sudan University of Science and Technology for their support and un-lasting encouragement.
At last but not least, I would like to convey special thanks and appreciations to my dear wife Salma Ahmed for her unlimited patience, support and encouragement.

Abstract

Tuberculosis is still one of the major health problems worldwide, with high mortality and morbidity. While third of the world population is infected with TB bacilli, the situation is getting worse by the rising emergence of drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Conventional method for drug susceptibility testing requires months before results can be reported. However, rapid methods such as phage assay have been developed and recorded as useful tool for quick diagnosis.

This study is descriptive cross-sectional laboratory based study which aimed to evaluate the usefulness of phage assay compared to proportional method and PCR in the diagnosis of MDR TB, to estimate the prevalence of MDR TB among tuberculosis patients and to detect the presence of rpoB gene among multidrug resistant isolates.

This study was conducted in Kassala State during the period from August 2009 to January 2012. Sputum specimens were collected from ninety acid fast bacilli consented patients (54 males and 36 females). Sputum specimens were processed for direct D29 and culture. All successful cultured isolates were subjected to biochemical tests for phenotypic characterization and further genotypic confirmation was made by amplification of IS *6110*. For drug susceptibility testing, proportional method was adopted followed by both indirect D29 and amplification of rpoB gene.

The results showed that both males and females in different age groups were infected with TB and those between 21-50 are of the highest infection rate. 21 (23.3%) of the specimens were categorized as rifampicin resistant by direct D29 method, 75/90 (83.3%) of the specimens showed growth on LJ medium similar to MTB complex

colonies while 5/90 (3.3%) were identified as rapid growers.60 out of the 75 slow growers (80%) were confirmed as MTB complex members depending on their biochemical characters (PNB, catalase and nitrate reduction). DST result for the 60 MTB isolates showed that 31/60 were drug resistant and that isoniazid compose for the highest percentage of resistance (20/31), followed by rifampicin (19/31) while MDR was detected in 18/60 of the isolates. All the 60 slow growers were confirmed as MTB by their positive IS 6110 results and 15/60 were rpoB positive. In conclusion, the study highlighted the high prevalence of MDR TB in Kassala State. Moreover D29 phage method in its first trial of application in Sudan revealed high sensitivity and specificity, which when combined to its major character of time saving (3 days compared to 70 days in DST) makes it a promising method for rapid uncostly diagnosis of MDR TB.

مرض السل لا يزال واحدا من المشاكل الصحية الكبرى في جميع أنحاء العالم، مع ارتفاع في معدل الوفيات .بينما يصاب ثلث سكان العالم بعصيات السل، يزداد الوضع سوءا بسبب ظهور سلا لات المتفطرة السلية الم قاومة للأدوية. الطريـ قة التـ قليدية لاختبار الحساسية للأدوية يتطلب شهورا قبل أن يتم التوصل للنتائج. وبالرغم من ذلك، فـ قد تم تطوير الطرق السريعة مثل فحص الفيروس اللاغم للبكتريا وسجلت بوصفها أداة مفيدة للتشخيص السريع.

هذه الدراسة الوصفية الم قطعية علي الأساس المخبري هدفت إلى تـ قدير مدى جدوى الفحص بالفيروس اللاغم للبكتريا مـ قابل الطريـ قة النسبية التـ قليدية ، وطريـ قة PCR في تشخيص مرض السل متعدد الم قاومة للأدوية ، لتـ قدير مدى انتشار السل الم قاوم للأدوية بين مرضى السل، والكشف عن وجود جينة rpoB بين العزلات متعددة الم قاومة للأدوية و قد أجريت هذه الدراسة في ولاية كسلا في الفترة من أغسطس 2009 إلى يناير 2012. جمعت عينات من البلغم موجبة لوجود عصيات السل العصية علي الحمض لعدد 90 مريض بعد اخذ موافـ قتهم (54 من الذكور والإناث 36). تم تجهيز عينات البلغم لإجراء فحص D29 المباشر والتزريع. وتم إخضاع جميع العزلات الناجحة لاختبارات كيميائية حيوية لتحديد الشكل المظهري وتم التأكيد وراثيا بتفاعلات البلمرة الجزيئيه *IS 6110*. واعتمدت الطريـ قة النسبية لإجراء اختبارات الحساسية للدواء، تليها كل من D29 غير المباشرة وتفاعل البلمرة التسلسلي للجين الم قاوم rpoB.

أظهرت النتائج كل من الذكور والإناث في الفئات العمرية المختلفة قد أصيبوا بمرض السل والذين تتراوح أعمارهم بين 21-50 هي من أعلى معدلات الإصابة. وبينت الدراسة ان 21 (23.3٪) من العينات كان من نوع السل الم قاوم لعـ قار الريفامبيسين بواسطة طريـ قة D29 المباشر . 75/90 (83.3٪) من العينات صنفت علي حسب النمو في وسط LJ كمماثلة لمجمع مستعمرات MTB في حين تم تحديد 5/90 (3.3٪)، كسريعة النمو (المتفطرة غير السلية). وتأكد من وجود 60 من 75 عينة بطيئة النمو (المتفطرة السلية) (80٪) تنتمي لمجمع MTB اعتمادا على الصفات البيوكيميائية (PNB، الكتاليز, اختزال النترات). وأظهرت نتائج اختبار الحساسية ل 60 MTB من العزلات ان 31/60 كانت مـ قاومة للادوية و شكل الإيزونيازيد أعلى نسبة للم قاومة (20/31)، يلية الريفامبيسين (19/31) في حين تم الكشف عن السل متعددة الم قاومة للأدوية ل 18/60 من العزلات. كما تم التأكد من أن كل ال 60 عينة من العزلات بطيئة

النمو MTB بواسطة نتائج ايجابية لفحص *IS 6110* و 15/60 كانت إيجابية.لفحص rpoB .

في الختام، هذه الدراسة سلطت الضوء علي ارتفاع معدلات انتشار السل المـ قاوم للأدوية في ولاية كسلا. وعلاوة على ذلك كشفت ان طريـ قة الفيروس اللاغم للبكتريا D29 في المرة الأولى من تطبيـ قه في السودان ذو حساسية عالية ونوعية ، بالإضافة للميزة الرئيسية وهي توفير الو قت (3 أيام مـ قابل 70 يوما ل DST) مما يجعل منها وسيلة تشخيصية سريعة غير مكلفة لمرض السل متعدد المـ قاومة للأدوية.

TABLE OF CONTENTS

List of Figures

List of Tables