قال الله تعالى

وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ ۖ وَسَتُرَدُّونَ إِلَىٰ عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُمْ بِمَا كُنْتُمْ تَعْمَلُونَ

صدق الله العظيم

سورة التوبة الآية ١٠٥

DEDICATION

To the memory of my brother Ali

May his love, devotion to family, and

his zest for life remain

a constant source of inspiration and

his memory always be for a blessing..

To

My father & mother...

Who provide me hopes, happiness, and

successfulness..

To

My brothers & sisters…

For their support & kindness

To

All persons whom I loved

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, thanks for Allah 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 guide,

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

Deep thanks for Miss Eman Osman and Mrs. Ahmed Hassan for their help.

Finally thanks for my colleagues.

Abstract

Simple, rapid, and sensitive methods that enhance the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) from sputum specimens are needed. This study compared the sensitivity of ZN stain and polymerase chain reaction (PCR) in the detection of *M. tuberculosis* from sputum specimens to achieve early and proper diagnosis in order to start accurate regimen.

this is a cross-sectional laboratory-based study in which ١٧١ sputum specimens were collected from patients suspected of having pulmonary tuberculosis attending Abu-Anga Teaching Hospital, El Sha'ab Teaching Hospital and the Tuberculosis Reference Laboratory at the national Health Laboratory in Khartoum, Sudan, during the period from January to March 2010.

Sputum specimens were examined using Ziehl-Neelsen stain; all sputum specimens extracted by Isopropanol method to obtain DNA and subjected to PCR amplified IS6110 insertion sequence in terms of sensitivity. At same time all sputum specimens were inoculated in Lowenstein Jensen (LJ) media and incubated at 37°C.

Only 37(22%) were acid fast bacilli positive, whereas 145(85%) were PCR positive with bands typical to the target sequence of IS6110 as showed by the standard DNA marker, Ziehl-Neelsen technique sensitivity was found to be ٢٦% compared to PCR assay.

Concerning cultivation of all sputum specimens on LJ media there were only 23.4% showed MTC-like colonies in LJ media (dry, rough and pale yellow), whereas 5.8% were considered rapidly growing *Mycobacterium*, and 70.8%

samples revealed contamination or no growth. Further biochemical tests were used beside colonial morphology in order to confirm the existence of *Mycobacterium tuberculosis* complex.

The study concluded that though the sensitivity of ZN stain was quietly decreased, PCR assay provides a significant improvement in diagnosis of pulmonary tuberculosis.

ملخص الاطروحه

للحوجه الماسه لأكتشاف طرق بسيطه ،سريعه، وحساسه تساعد على تشخيص المتفطره الساليه المسببه للسل الرئوي هدفت هذه الدراسه لتقارن حساسية صبغة زيل – نلسون وتفاعل البلمره التسلسلي في التعرف على المتفطره الساليه من عينات البلغم.

تم جمع ١٧١ عينه بلغم لمرضى اشتبهوا في اصابتهم بالسل الرئوي و أحضروا من مستشفى أبو عنجة التعليمي، مستشفى الشعب التعليمي، والمعمل المرجعي للدرن بالخرطوم، السودان، في الفترة من يناير إلى مارس ٢٠١٠.

تم فحص العينات باستخدام صبغة زيل – نلسون و تم أيضا استخراج الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين من جميع عينات التفاف بطريقة الأيسوبروبانول وتم إختبارها بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي للتحديد حساسيه صبغة زيل – نلسون. وفي نفس الوقت قد تم تزريع كل العينات بوسط ليونيستين جنسن وتحضينها تحت درجة حراره.37°C.

اظهرت النتائج ٣٧ (٢٢%) عينه موجبة لصبغة العصويات المقاومة للأحماض بينما145 (٨٥%) عينه كانت موجبه لتفاعل البلمره التسلسلي ذلك أنها أظهرت حزمة مطابقة في القياس للمستهدف *IS 6110* كما هو مشار إليه بواسطة المؤشر القياسي للحامض النووي الرايبوزي منزوع الأوكسجين، وجد ان حساسية صبغة زيل – نلسون ٢٦% مقارنة بتفاعل البلمرة التسلسلي .

وفيما يتعلق بزراعة عينات البلغم في بوسط ليونيستين جنسن فقط ٢٣.٤% اظهرت مستعمرات تشبه عضيات الباكتيريا المتفطرة الدرنية بوسط ليونيستين جنسن، بينما ٥.٨% اعتبرت متفطرة سريعة النمو و ٧٠.٨% من العينات اظهرت تلوث أو لم تنمو . تم استعمال اختبارات بايوكيميائيه اضافيه بجانب شكل المستعمرة للتأكد من وجود المتفطره الساليه .

وبهذا اكدت الدراسه أن حساسيه صبغة زيل – نلسون ضعيفه ، وأن إستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي يوفر تحسين ذو محتوى ملحوظ في تشخيص فحص السل الرئوي

Table of Contents

List of Figures

LIST OF TABLES

LIST OF Abbreviation

AFB	Acid Fast Bacilli
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bp	Base pair
CD	Culster Differention
CO2	Carbon doxide
CMI	Cell Mediated Imunity
CSF	Cerebro Spinal Fluid
CR	Complement Receptor
DNA	Deoxyribo Nuclic Acid
dntp	deoxynucleotide triphosphates
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
DW	Distell Water
HIV	Human Immunodiffiency Virus
IFN g	Interferon gamma
IL	Interlukin

INH	Isoniazid
IUATLD	International Union Against TB and Lung Disease
LAM	Lipoarabinomannan
LJ	Lowenstein-Jensen
MDR	Multy Drug Resistant
Mgcl2	Magnesium Chlorite
MTB	Mycobacterium Tuberculosis
MTC	Mycobacterium Tuberculosis Complex
NaOH	Sodium Hydroxide
NTB	Non Mycobacterium Tuberculosis
OT	Old Tuberculin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNB	Para – NitroBenzoic acid
PPD	Purified Protein Derivative
RIF	Refampin
rRNA	Ribosomal Ribo Nuclic Acid
TBE	Tris Bolic Acid
TCH	Thiophene-2-Carboxy Acid Hydrozide
UV	Ultra Violet
WHO	World Health Organization