Dedication

To ……

Dedicated to my parents father /mother

To ……

My wife

To ……

My kids Yousria and Mohamed

Acknowledgments

I am greatly indebted to my supervisor Dr. Ibrahim Mohamed Elhasan, Head department of Parasitology and Medical Entomology Institute of Endemic disease, University of Khartoum for his guidance my postgraduate studies, and whose expertise, understanding, and patience, added to and the valuable insights into this work. Without his stimulating suggestion, encouragement and constant guidance this research would not have been possible.

Sincere and genuine thanks also go to my, co supervisor Dr Humodi Ahmed Saeed, Dean Faculty of Medical laboratory Science, Sudan University for Science Technology, who extended all kinds of support, assistance during study and I had pleasure to work with.

Thanks go to the staff members of the Institute of Institute of Endemic Disease, University of Khartoum a wonderful work place Profeser. Montasir Ibrahim, Dr. hiba Salah Eldeen and Badria Saeed, deserves special mention for providing skilful technical assistance.

My appreciation extended to the staff members Sennar Hospital Dr Mohamed Fadel Elseed Nasir and Nada Chief medical laboratory technician

Thanks go to Abyay medical health center, Abongo Chief Technician and Samia.

My thanks are also extended to the staff members of Sennar Malaria center, Dr Ali, Abed Elmonim Faza.

I also owe many thanks to the patients and patients guardians who participated in the study for their cooperation and patience during the study period.

Thanks to my family for the support they provided me through my entire life and for their sincere encouragement to pursue my interests.

Abstract

The aim of this work was to characterize the malaria parasite population in Central Sudan Sennar State. A total of 434 blood sample were collected from malaria suspected patients, who attend Abyay clinical center during September to October 2006 . 268 samples out of 434 samples (62%) were detected to be positive for malaria by microscopic examinatiot and rapid ICT test ,all the positive samples due to *P.falciparum* Prevalence of malaria was found to be (38%) . Based on the clinical data, the malaria patients were classified as mild symptoms 14 (5.2%), moderate symptoms222 (82 %) and sever symptoms 32 (11.9%).

Among malaria patients 221 (82.3%) were detected as mild anemia , 8 (3.4%) as sever anemia and 39 (14.3%) as subject with normal hemoglobin level .Among malaria patients there are 3 patients with cerebral malaria .Patients were categorized in to five groups <=5 years 54 patients (20.1%), 6-14 years 144 patients (53.7%), 15-40 years 59 patients (22.0%), 41-60 years 9 patients (3.4%), >=61 years 2 patients (0.7%). Malaria prevalence is high in despite of control effort produced by the Roll back malaria program.

Allelic diversity was analyzed in the highly parasite polymorphic genes encoding the merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 by polymerase chain reaction. Different size polymorphism was detected in all genes analyzed with 10 & 9 variants for Msp1 & Msp2 alleles. Moreover based on the studied genetic markers, most infections consisted of more than one genetically distinct parasite colone. This results suggest that the parasite population circulating in this region are genetically homogeneous and point to an association between the extent of parasite genetic diversity and the intensity of malaria transmission.

Different genotypes were found to be associated with severity of disease. In this respect, association between parasitemia and anemia (P=0.001), parasitemia and age (P=0.002), and between parasitemia and polymorphism regions of Msp1 and Msp2 (P=0.004 & 0.001). In addition some variants of allelic families found to be associated with malaria in children (5-14 years of age.) Individuals living malaria endemic areas generally harbor multiple parasite strains which known by multiplicity of infection (MOI) and can be used as an indicator of immune status. One of goals of this study was re-examine the MOI in *P.falciparum* infected patient, and to relate in to severity of disease. Result of

genotyping reveal that MOI was significantly higher at the peak of transmission season and the majority of PCR positive subjects had multiple infections at that time points (64%). There was significant correlation between MOI and parasite density(P=0.00), as the higher parasite counts increases the probability of having multiple infections. Also significant correlation between MOI and variants of Mad20, K1, and RO33 (P=0.000).

P.falciparum isolates of this area were genotyped for detection of mutations in *P.falciparum* chloroquine transporter (*Pf*crt 76T) and multidrug resistance (*Pf*mdr1 86Y) genes. High levels of Chloroquine resistance have been found in the study area, also there was strong significant association between the prevalence of *Pf*crt 76T and *Pf*mdr1 86Y which are located into two different chromosomes and conferring resistance against chloroquine. Significant correlation was observed between *Pfcrt 76T* and anemia ((P=0.003), Fc27 allele (p=0.03) and *Pfmdr1*(P=0.00).

□□□□□□□□

يهدف هذا العمل إلى دراسة التصنيف الجزيئي لطفيلي الملاريا في ولاية سنار(وسط السودان). تم جمع (434) عينة من أشخاص يشتبه في إصابتهم بالملاريا وذلك في مركز صحي أبيي بولاية سنار، في الفترة من سبتمبر وحتى أكتوبر 2006م، وهي تمثل أعلى فترة لنقل الملاريا في هذه المنطقة. من هذه العينات وجد أن 268 عينة (62%) مصابة بالملاريا سببها طفيلي الملاريا من نوع فالسيبارام وذلك عند إستخدام الفحص المجهري والمناعي الكروماتوقرافي السريع، وبلغت نسبة انتشار المرض (38%). وحسب الأعراض المرضية تم تقسيم مرضى الملاريا إلى ذوي أعراض بسيطة 14 بنسبته (5.3%)، أعراض متوسطة 222 بنسبة (82.8%)، أعراض حادة 32 بنسبة (11.9%). وأن الفئات المرضية كانت تمثل 221 حالة أنيميا بسيطة بنسبة (82.5%)، و 8 حالات أنيميا حادة بنسبة (3.0%)، و 39 حالة ملاريا غير أنيميا بنسبة (14.5%). ووجد أن بين الحالات المرضية أن هنالك 3 حالات دماغية. تم وضع المرضى في 5 مجموعات عمرية، الفئة الأولى (<=5 سنوات) 54 فرد بنسبة (20.2%)، والثانية (من 6-14 سنة) 144 فرد بنسبة (53.7%)، والثالثة (من 15-40 سنة) 89 فرد بنسبة (22.0%)، والرابعة (من 41-60 سنة) 9 أفراد بنسبة (3.4%)، الخامسة (61 سنة فأكثر) فردين بنسبة (0.7%). وبالرغم من الجهود المبذولة بواسطة برنامج دحر الملاريا فإن نسبة انتشار الملاريا في المنطقة عالي.

وقد أوضحت دراسة التباين الجيني للبلازموديوم فالسيبارام العديد من الصور الو راثية في المناطق الجغرافية المختلفة، وأن هذا التباين أدى لتعقيد الإصابة بالملاريا، وأنه يمثل أحد العقبات في طريق تطوير سبل السيطرة على الملاريا. ولما كان التوصيف الجزئي لطفيل في منطقة الدراسة أحد أهداف هذه الدراسة فقد تم فحص التباين الجيني لطفيل في هذه المنطقة، وذلك بدلالة الجينات التي تؤدي لتكوين بروتين سطح الموروزويت 1و 2، وذلك بواسطة تفاعل الإنزيم مجمع السلسلة (**PCR**). وقد أوضحت النتائج وجود عدة صور لاليلات الجينات التي درست، حيث ظهرت 10 صور جينية للجين (**MSP1**) و 9 صور للجين (**MSP2**). هذا وقد وجد أن معظم العينات (64%) مصابة بأكثر من طفيل واحد في نفس الوقت. وقد أشارت هذه النتائج إلى أن أنواع الطفيل في هذه المنطقة متجانسة بالرغم من تميزها بتعدد الصور (**Polymorphism**)، وأنه يوجد ارتباط بين التباين الجيني لطفيل ومدى الإصابة بالملاريا، هذا وقد وجد أن بعض الصور الجينية مرتبطة بشدة المرض، حيث وجد في هذا الإطار ارتباط بين حالات فقر الدم وكثافة الطفيل من جه (**P=0.001**)، وصورة جينات (**MSP1 & MSP2) P=0.004and 0.001**) من جهة أخرى، هذا بالإضافة إلى صور محددة من أليلات هذه الجينات خاصة في الأطفال عمر 6 وحتى 14 سنة، مما يدل على ارتباط هذه الصور الجينية بشدة المرض بمنطقة سنار. في هذه الدراسة أيضاً تم فحص حالة الإصابة بأكثر من طفيل في العينة الواحدة، حيث أن هذه الظاهرة تعتبر ميزة لمناطق

الملاريا المستوطنة، وأن لها علاقة بشدة المرض والحالة المناعية للمريض. وأشارت الدراسة إلى أن هذه الظاهرة موجودة بكثرة في ذروة موسم انتقال المرض، حيث وجد أن معظم العينات مصابة بأكثر من طفيل. وقد لوحظ ارتباط زيادة هذه الظاهرة بكثافة الطفيل((**P=0.00**، إذا أنها تزيد كلما زاد تعداد الطفيل. كذلك يوجد ارتباط معنوي بين (**MOI**) و صورة الجينات ((**Mad20, K1, & RO33 (P=0.00**).

وتهدف هذه الدراسة أيضاً إلى معرفة انتشار الملاريا المقاومة للكلوروكوين، حيث وجد أن نسبة هذه الظاهرة مرتفعة جداً. حيث لوحظ وجود علاقة ذات دلالة معنوية بين وجود الطفرات الأليلية المرتبطة بمقاومة طفيل الملاريا لعقار الكلوروكوين (**Pfcrt76T**) و((**Pfmdr1 86Y P=0.00**)) والتي تقع في كروموسومين مختلفين من جهة، وبين (**Pfcrt76T**) والانيميا (**P=0.003**)، و **P=0.03**) ((**Fc27**).

LIST OF CONTENTS

List of tables

List of Figures

List of maps

List of Abbreviations

ACTS	Artimesin based combination therapy
AMA-1	Apical Membrane Antigen - 1
CQ	Chloroquine
CQR	Chloroquine resistance
CSP	Circum sporozoite protein
CT	Combination therapy
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphate
EBA	Erythrocyte-Binding Antigen
EDTA	Ethylinediaminetetracetic acid
G.6.P.D	Glucose-6- Phosphate Dehydrogenase
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICAM-!	Intracellular Adhesion Molecule One
MSP-1	Merozoite Surface Protein - 1
Msp2	Merozoite surface protien2
Na^+—H^+	Sodium hydrogen ions
P.	Plasmodium
PCR	Polymersae Chain Reaction
*Pf*crt	*P. falciparum* chloroquine resistant
*Pf*dhfr	*P. falciparum* dihydrofolatereductase
*Pf*dhps	*P. falciparum* dihydropetronatesynthase
*Pf*EMP1	*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1
*Pf*mdr	*P. falciparum* multidrug resistant
PGtuDH	Plasmodium Glutamate Dehydrogenase
pLDH	Plasmodium Lactate Dehydrogenase
PNG	Papa New Gunea
RFLP	Restriction fraction length polymorphism
SE	South East
SNPs	single nucleotide polymorphism
SP	Sulfadoxine-pyrimethamine
TBE	Tris Boric EDTA
TNF	Necrosis Factor
VSA	Variant surface antigens
WBC	White blood cell
WHO	World health organization