Acknowledgements

I would like to thank all those who helped me during this study, especially, my supervisors, Dr. Ibrahim Mohamed Elhassan , Head Department of Parasitology, Institute of Endemic Diseases, University of Khartoum for his supervisions, training, supplement of reagents and continuous support during the field and laboratory work.

I would also like to express my deep thanks to Dr. Khalida Mirghani Hamza, the vice-dean of the faculty of sciences of medical laboratories, Sudan;s university and the co-advisor of this work for her continuous help and encouragement throughout the periods of this work.

Special thanks to Dr.. Hammodi Ahmad Saead, Dean of faculty of Sciences of Medical Laboratories, Sudan University of Sciences and Technology, for his continuous help and encouragement during this study.

My thanks are extended to Dr.Malik Elfadni, head of department of hematology for paving financial obstacles in collaboration with the Dean of the faculty. A lot of thanks are extended to Dr Tarig Alfatih for his co-operation in solving administrative problems.

I would like to thank the group of Malaria Research in the institute of endemic diseases, faculty of medicine, University of Khartoum, specially Mr Mishaal, Miss Wigdan, Miss Reem, Miss Badria, Miss Suha, Miss Zianab, Madam Mirvat and Mr Mohammed Mohy for their generous technical help during preliminary trials of this work and data analysis.

Great thanks for Professor M. M. Mukhtar for supplying printer for ELISA, fruitful suggestions and technical help during ELISA work. My thanks are extended to my colleagues and all members

of faculty of Sciences of Medical Laboratories, University of Sudan, Khartoum, Sudan.

Dedication

This work is dedicated

to those who care

about mankind welfares

specially

those working to combat endemic

diseases

my

family and friends.

Abstract

A total of 570 samples of both sexes were collected from malaria-suspected patients who attended Medani Pediatric and adult teaching Hospital during August-December 2005. That period was the peak of malaria transmission season in the area. Out of these, 155 samples were detected to be positive for malaria and 140 cases (90%) out of the positive samples were due to Plasmodium falciparum and the rest, which were excluded from the study, (15 patients) were due to other plasmodium species. Based on the clinical data, the Plasmodium faciparum patients were classified as asymptomatic (7 patients) and symptomatic patients (133 patients). Among the symptomatic patients, 106 (75.7%) were detected as mild anemia, 24 (17.1%) as severe anemia and 10 (7.2%) as subject with normal hemoglobin level. Among the symptomatic patients also there are 22 cerebral malaria, 12 pregnant, 8 patient with splenomegally and two with hepatomegally. Patients are categorized into 4 age groups, group 1 has 71 (50.7%) individuals followed by groups 2,3, and 4 which have 44 (31.4%), 17 (12.1%), and 8 (5.8%) individuals respectively. One of the goals of this work was molecular characterization of the parasite populations circulating in Gazira, central part of Sudan. This work investigated the extent of genetic polymorphism in P. falciparum field isolates from Gazira. Allelic diversity was analyzed in the highly polymorphic parasite genes encoding the merozoite surface proteins-1 (MSP-1) and -2 (MSP-2) and the glutamate-rich protein (GLURP) by the polymerase chain reaction. Different size polymorphism was detected in all genes analyzed, with 13 and 8 variants for the MSP-1 and MSP-2 alleles, respectively, and 5 size variants for the GLURP. Moreover, based on the studied genetic markers, most infections consisted of more than one genetically distinct parasite clones. These results suggest that the *P. falciparum* parasite populations 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 high parasitemia and anemia on one hand and variants of K1 were found, MAD20, RO33 and FC allelic families on the other hand. In addition, some

variants of the allelic families were found to be associated with children between 0-10 years of age. Individuals living in 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 the goals of this study was to examine the MOI in Plasmodium faciparum-infected samples and to relate it to severity of the disease. Results of genotyping reveal that MOI was significantly higher at the end of transmission season and the majority of PCR positive subjects had multiple infections at that time points (54%). No association between MOI and severity of disease was observed. MOI did not vary over age at any time points. There was a significant correlation between MOI and parasite density, as the higher parasite counts increases the probability of having multiple infections. One of the major goals of this work was the investigation of the immune response of glutamate rich protein among the study population as an indicator for acquisition of protective immunity. This is achieved by estimation of IgG, IgG1, IgG3 and IgM antibodies directed against GLURP-R0, GLURP-R1 and GLURP-R2. The results indicate comparatively high titres of these antibodies to the three fragments of GLURP, although R2 and R0 encountered with significantly higher concentrations of the antibodies. The results also showed that IgG3 was presented with high concentration followed by IgG1 suggesting their protective role and their major participation in acquisition of immunity to malaria. The results of association between immune response and different strain of Plasmodium population isolated in this work reveal that some strain are encountered with high immune response and severity of malaria. This association supports the speculation of the presence of strain-specific immunity and premunition among inhabitants of malaria endemic areas. The results also re-enforce the ongoing announcement that any future malaria vaccine should include GLURP fragments notably GLURP-R2 and GLURP-R0.

Ethical clearance for this work has been approved by the ethical committee of the institute of endemic diseases, faculty of medicine, University of Khartoum.

الخلاصة

تم جمع 570 عينه من اشخاص من الجنسين مشتبه فى اصابتهم بالملاريا وذلك من مستشفيات مدنى للاطفال و الكبار فى الفترة من سبتمبر وحتى ديسمبر 2005 وهى فترة نهاية موسم انتقال الملاريا فى هذه المنطقه. من هذه العينات وجد ان 155 مصابة بالملاريا وان 140 (90%) منها سببها طفيل الملاريا من نوع فالسبرم. حسب الاعراض المرضية تم تقسيم ال 140 عينه الى غير عرضيه (7 عينات) و عرضيه (133 عينه) وان الفئات العرضيه كانت تشمل 84 حالة انيميا خفيفه 31 حالة انيميا خطيره و 18 حاله ملاريا غير انيميه. ووجد ان بين الحالات المرضيه هنالك 22 حالة ملاريا دماغيه، 12 حالة حمل و 8 مرضى بتضخم الطوحال و 2 بتضخم الكبد. تم وضع المرضى في 4 مجموعات عمريه. الفئه الأولى 71 فرد (50,7%) والثانيه 44 فرد (31,4%) والثالثه 17 فرد (12,1%) والرابعة 8 افراد (5,8%). دراسة التباين الجيني أوضحت أن للبلازموديوم فالسبيرم العديد من الصور الوراثيه في المناطق الجغرافيه المختلفه وأن هذا التباين أدى لتعقيد الاصابه بالملاريا وانه يمثل احد العقبات في طريق تطوير سبل السيطره على الملاريا. ولما كان التوصيف الجزئي للطفيل في منطقة الدراسه احد اهداف هذه الدراسه فقد تم فحص التباين الجيني للطفيل في هذه المنطقه وذلك بدلالة الجينات التي تؤدي لتكوين بروتين سطح الميروزوبت 1و 2 و البروتين الغنى بالقلوتاميت و اوضحت النتائج وجود .(PCR) ذلك بواسطة تفاعل الانزيم مجمع السلسله عدة صور لاليلات الجينات التى درست حيث ظهرت 13 صورة جينية للجين هذا و قد وجد ان .GLURP و 5 صور للجين MSP2 و 8 صور للجين MSP1 معظم العينات (54%) مصابة باكثر من طفيل واحد فى نفس الوقت .و قد اشارت هذه النتائج الى ان انواع الطفيل غى هذه المنطقة متجانسة بالرغم من

و انه يوجد ارتباط بين التباين الجيني (Polymorphism) تميزها بتعدد الصور للطفيل و مدى الاصابة بالملاريا. هذا و قد وجد ان بعض الصور الجينية مرتبطة بشدة المرض. حيث وجد قى هذا الاطار ارتباط بين حالات فقر الدم و كثافة من FCو RO33 و MAD20 و K1 الطفيل فى الدم من جهه و صور جينات جهة اخرى. هذا بالاضافة الى صور محددة من اليلات هذه الجينات خاصة فى الاطفال من عمر يوم وحتى 10 سنوات مما يدل على ارتباط هذه الصور الجينية بشدة المرض فى منطقة الجزيرة. فى هذه الدراسة ايضا تم فحص حالات الاصابة باكثر من طفيل فى العينة الواحدة حيث ان هذه الظاهرة تعتبر ميزة لمناطق الملاريا المستوطنة. وان لها علاقة بشدة المرض و الحالة المناعية للمريض. و اشارت الدراسة الى ان هذه الظاهرة موجودة حتى فى نهاية فترة موسم انتقال المرض حيث وجد ان معظم العينات مصابة باكثر من طفيل. و قد لاحظت عدم ارتباط زيادة هذه الظاهرة بشدة المرض او فئة عمرية محددة. ووجد ان هناك ارتباط بين كثافة الطفيل فى الدم و هذه الظاهرة. احد اهم اهداف هذه الدراسة اختبار الاستجابة المناعية لثلاث اجزاء من البروتين الغنى بالقلوتاميت فى افراد هذه الدراسة. و تم ذلك بتقدير تركيز الاجسام (R2 و R1 و R0) المضادة المنتجة استجابة لاجزاء البروتين الثلاث. اوضحت النتائج ان افراز الاجسام المضادة لهذه الاجزاء من البروتين اكثر عندما تقارن بالحالات قوبلا بافراز تراكيز اعلى مما R0 و R2 القياسية الغير مرضية وان الجزئين هي الاكبر IgG3 و ان تركيز الاجسام المضاده من نوع R1 قوبل به الجزء تراكيزها كانت طبيعيه كالحالات IgG4و IgG2 و أن IgG1 تركيزا يليه القياسيه الغير مرضيه. وعلى هذا فان النتائج توضح دور هذه الاجسام المضاده في المناعه المكتسبه ضد الملاريا. كذلك اوضحت نتائج دراسة علاقة الاستجابه المناعيه والصور الجينيه ان هنالك بعض الصور الجينيه

للطفيل مسؤوله عن شدة المرض وتشيرالى وجود المناعه المكتسبه لدى الافراد الذين قضوا و قتا طويلا في مناطق الملاريا المتوطنه وان هذا الارتباط يشير الى وجود مناعه خاصه ببعض الصور الجينيه ويدعم تنائج الابحاث الا قائلة في اي تركيبه للحصول على مصل R0و R2 بضرورة ادخال جزيء البروتين فعال ضد الملاريا.

List of Contents

List of Tables

.

List of figures