



## Laboratory assays for the detection of malaria-transmission reducing activity



**Mike van der Kolk**  
PhD-thesis 2007





# Laboratoriumbepalingen voor de detectie van malaria-transmissie reducerende activiteit / *Laboratory assays for the detection of malaria transmission reducing activity*

## Proefschrift/PhD thesis

Mike van der Kolk, Radboud Universiteit Nijmegen, 30 maart 2007

[mikevanderkolk@tele2.nl](mailto:mikevanderkolk@tele2.nl) [m.vanderkolk@crcn.umcn.nl](mailto:m.vanderkolk@crcn.umcn.nl)

## Samenvatting

Humane malaria is een parasitaire ziekte, die meer dan 200 miljoen ziekte- en meer dan één miljoen sterfgevallen per jaar veroorzaakt, met name in kinderen onder vijf jaar en voornamelijk in Afrika. Malaria wordt verspreid in de bevolking door seksuele vormen van *Plasmodium* parasieten (gametocyten), die van besmette naar vatbare mensen worden overgedragen door *Anopheles* muggen (transmissie). Mensen die leven in gebieden waar malaria voorkomt, kunnen natuurlijke immuniteit ontwikkelen tegen stadia van de parasiet, die betrokken zijn bij transmissie. Deze transmissie reducerende activiteit (TRA) kan worden bepaald met een laboratoriumtest, de Standaard Membraan Voeding Test (SMFA), of met een vergelijkbare biologische test in het veld, de Directe Membraan Voeding Test (DMFA).

De SMFA bootst natuurlijke infectie na, door muggen te voeden met een mengsel van menselijke rode bloedcellen, die zijn geïnfecteerd met gekweekte *P. falciparum* gametocyten en test- of controle-serum. Testserum is afkomstig van mensen die blootgesteld zijn geweest aan malaria, en controle-serum van niet-immune Nederlandse bloeddonors. In de DMFA wordt bloed van gametocytendragers in de aanwezigheid van eigen (test-) of controle-serum gevoed aan muggen. In de muggenmaag barsten de rode bloedcellen open, komen mannelijke en vrouwelijke gameten vrij en vindt bevruchting plaats. Dat gebeurt in de SMFA en de DMFA (en bij natuurlijke infectie). Na verloop van tijd (vanaf twee dagen na infectie) kunnen oöcysten verschijnen in de wand van de muggenmaag. Transmissie blokkerende antilichamen in test serum kunnen dit proces onderbreken, waardoor het aantal oöcysten vermindert. TRA wordt gedefinieerd als het relatieve verschil in oöcysten aantal tussen controle en testvoedingen.

De eerste doelstelling van dit proefschrift was de relatie van TRA met transmissie intensiteit te onderzoeken in de lokale bevolking in Kameroen (Hoofdstuk 2-4). De transmissie intensiteit werd gedurende een jaar bepaald in een geselecteerd onderzoeksgebied, de wijk Dakar in de hoofdstad van Kameroen, Yaoundé (Hoofdstuk 2). *A. gambiae* en *A. funestus* waren de belangrijkste muggensoorten voor de transmissie van malaria in Dakar. De transmissie intensiteit werd bepaald op 34 besmettelijke beten per mens per jaar (besmette beten per persoon per jaar, bbpj). *A. gambiae* (30 bbpj) droeg meer bij aan transmissie dan *A. funestus* (4 bbpj). De transmissie intensiteit in Yaoundé was ongeveer vijf keer lager dan in het tweede onderzoeksgebied, het dorp Koundou (eerder gerapporteerde transmissie intensiteit van 177 bbpj).

Jaarlijks had gemiddeld 35% van de mensen in Yaoundé aseksuele *P. falciparum* parasieten en gemiddeld 4,4% had gametocyten (Hoofdstuk 3). De aanwezigheid van hoge parasitaemie (>400 parasieten /  $\mu$ l bloed) en van gametocyten was seizoensgebonden en leeftijdsafhankelijk. De leeftijdsgroep van 0-15 jaar vertegenwoordigde 83% van de gametocytendragers. Kinderen zijn daarmee verreweg belangrijkste bron voor malaria overdracht in dit gebied.

TRA werd bepaald met de DMFA en werd vergeleken met leeftijd, gametocytendichtheid en transmissie intensiteit in Hoofdstuk 4. De gemiddelde leeftijd van gametocytendragers was lager in het gebied met de hogere transmissie intensiteit (de regio rond Koundou). De

frequentie van TRA onder gametocytendragers was 4.6 maal hoger in het gebied rond Koundou vergeleken met Dakar. Bovendien was er een tendens voor hogere TRA waarden in individuen met hogere aantallen gametocyten in het bloed. Een relatie tussen TRA en leeftijd kon niet worden vastgesteld. Hoe dan ook, TRA resultaten waren onderhevig aan matige reproduceerbaarheid.

De tweede doelstelling van dit proefschrift was de evaluatie en mogelijke verbetering van de SMFA methodologie (Hoofdstuk 5). Een uitgebreide analyse van eerder verzamelde data van 307 testsera (die tot zes keer per serum werden getest in 201 experimenten) lieten een aanzienlijke variabiliteit zien van TRA voor individuele sera. Niettemin kwamen vergelijkbare waarden van TRA vaker voor bij herhaalde metingen dan zou worden verwacht op grond van toeval (Hoofdstuk 5). Daarnaast was de kwantitatieve TRA beter reproduceerbaar dan het kwalitatieve SMFA uitleessysteem dat jarenlang werd gebruikt als gouden standaard. Verder was de variabiliteit in TRA groter tussen dan binnen experimenten. Sera kunnen daarom beter binnen dan tussen experimenten worden vergeleken.

In Hoofdstuk 6 werd de reproduceerbaarheid van TRA verder bestudeerd in herhaalde metingen, door vergelijking van oplopende concentraties van transmissie blokkerende antilichamen. TRA was sterk gerelateerd met concentraties van antilichamen tegen seksuele stadia (anti-Pfs25, anti-Pfs48/45). Daarbij was het aantal gevoede gametocyten een belangrijke factor. TRA waarden waren hoger als gametocyten werden verdund, bij elke geteste antilichaamconcentratie. Deze resultaten ondersteunen het gebruik van de toegepaste berekeningsmethode voor TRA (zoals bepaald in de aangepaste SMFA) als kwantitatieve maat voor transmissie reductie.

In Hoofdstuk 7 werd het bestaan van transmissieversterking (TE) bestudeerd in een groep menselijke sera uit drie verschillende geografische gebieden. Zowel TE als TRA werd aangetoond in deze sera. TE (7%) kwam veel minder voor in menselijke sera dan TRA (48%), en het effect van TE was over het algemeen zwakker. Verder correleerde slechts TRA (en niet TE) met seksueel stadium antilichamen. TE bestaat dus in sera uit malaria gebieden, maar het effect is beperkt vergeleken met het effect van TRA.

In Hoofdstuk 8 werd de verbeterde methodologie voor SMFA toegepast voor de beoordeling van de ontwikkeling van TRA in transmigranten in de Papoea provincie in Indonesië. De transmigranten waren niet eerder blootgesteld geweest aan malaria, terwijl in de Papoea provincie veel malaria voorkomt. TRA en seksueel stadium antilichamen (anti-Pfs230 en anti-Pfs48/45) namen al na één tot vier *P. falciparum* infecties toe. TRA wordt dus snel verkregen na blootstelling aan infectie.

In de discussie (Hoofdstuk 9) werden de voorwaarden voor minimale variabiliteit in TRA besproken en suggesties voor verbetering van SMFA gepresenteerd. Deze omvatten 1) vergelijking van serum monsters binnen experimenten, 2) vermindering van het aantal gametocyten (twintig tot veertig per  $\mu$ l), en 3) verhoging van het aantal muggen per voeding (van twintig tot meer dan veertig). Zo zou de SMFA beter overeenkomen met natuurlijke transmissie. We verwachten dat de aangepaste methode meer gedetailleerde studies mogelijk maakt, met name naar de ontwikkeling en het verloop van TRA in gebieden waar malaria veel voorkomt.

## Summary

Human malaria is a parasitic disease, which causes over 200 million clinical cases and more than one million deaths per year. Most cases occur in children aged below five and the most affected continent is Africa with about 90% of all cases. Malaria is spread by sexual forms of *Plasmodium* parasites (gametocytes), which are transmitted by anopheline mosquitoes from infected to susceptible humans. Human subjects in endemic areas may naturally acquire immunity against the various parasite stages involved in transmission. This TRA can be assessed by a laboratory assay, the SMFA, or a comparable field based bioassay, the DMFA.

The SMFA mimics natural infection by feeding mosquitoes with a mixture of human red blood cells, infected with cultured *P. falciparum* gametocytes, and test or control serum. Test serum is collected from malaria exposed human subjects, and control serum from non-immune Dutch subjects. In the DMFA, blood from gametocytes is fed to mosquitoes in the presence of autologous (test) or control serum. Fertilisation of male and female gametes takes place in the mosquito midgut, in both SMFA and DMFA (and in natural infection). As a result oocysts appear on the mosquito midgut wall. Transmission reducing antibodies in test serum can interrupt this process and reduce oocyst numbers. TRA is defined as the relative difference in oocyst numbers between control and test feeds.

The first objective of this thesis was to study the association between TRA and transmission intensity in local populations in Cameroon (Chapter 2-4). Transmission intensity was determined in a selected field site, Dakar quarter in the capital Yaoundé, during one-year follow up (Chapter 2). *A. gambiae* and *A. funestus* were the main vectors and the entomological inoculation rate (EIR) was 34 infectious bites per man per year (ibpy). *A. gambiae* (EIR = 30 ibpy) contributed more to transmission than *A. funestus* (EIR = 4 ibpy). The transmission intensity in Yaoundé was about five times lower than at the comparable study site in rural Koundou (previously reported EIR of 177 ibpy).

The average annual parasite prevalence in Yaoundé was 35% for *P. falciparum* asexual parasites and 4.4% for gametocytes (Chapter 3). The prevalences of high parasitaemias (>400 parasites/ $\mu$ l blood) and gametocytes showed seasonal and age-dependent variation. Children of zero to fifteen years represented 83% of gametocyte carriers, and they dominate the potential infectious reservoir in Yaoundé.

TRA was measured by DMFA and compared with age, gametocyte density and transmission intensity in Chapter 4. Peak prevalence of gametocytes occurred in a lower age group in the area with the higher transmission intensity (the region around Koundou). The probability that gametocyte carriers showed TRA was 4.6 fold higher in the Koundou area than in Dakar. In addition, there was a trend towards higher TRA values in individuals with higher gametocytaemias. A relationship between TRA (prevalence or level) and age could not be observed. TRA results, however, were subject to poor reproducibility.

The second objective of the thesis was to evaluate and possibly improve the SMFA methodology (Chapter 5). An extensive retrospective analysis of the data set comprising 307 serum samples (tested up to six times in 201 feeding experiments) showed that TRA values in repeated measurements had a substantially variable outcome for individual sera. However, TRA was more often reproducible than would have been expected by chance alone. In addition, as a quantitative measure TRA was better reproduced than the qualitative SMFA read-out that had been used for many years as a gold standard. The variability in TRA was larger between experiments than within experiments. Therefore, sera are better compared within rather than between experiments.

In Chapter 6, reproducibility of TRA was further studied by evaluating repeated measurements with increasing concentrations of transmission blocking antibodies. TRA associated strongly with concentration of anti-sexual stage (anti-Pfs25, anti-Pfs48/45)

antibodies. Gametocyte density was a significant cofactor in this association. TRA levels were higher if gametocyte suspensions were serially diluted at each antibody concentration tested. These results further support the use of the applied calculation methodology for TRA assessed by a modified SMFA as a quantitative measure for reduction of transmission.

In Chapter 7, the existence of transmission enhancement (TE) was studied in a set of human sera from three different geographic areas. The presence of both TE and TRA were demonstrated in these sera. The prevalence of TE (7%) by human sera was much lower than TRA (48%) and its effect generally weaker. Furthermore, only TRA (and not TE) correlated with sexual stage antibodies. Thus, TE exists in endemic sera, but its effect is limited compared to the effect of TRA.

In Chapter 8, the improved methodology for SMFA was applied for the assessment of natural acquisition of TRA in non-immune transmigrants in malaria endemic Papua, Indonesia. TRA and anti-sexual stage antibodies (anti-Pfs230 and anti-Pfs48/45) increased after one to four infections already. TRA is thus rapidly acquired upon exposure to infection.

In the discussion (Chapter 9), the conditions for minimal variability in the SMFA were further discussed and suggestions for improved methodology presented. These include 1) comparison of serum samples within experiments, 2) reduction of the number of gametocytes (20-40/ $\mu$ l), and 3) increase of the number of mosquitoes per test sample for assessment of oocysts (from 20 to about 40). In this manner, the SMFA will more closely reflect natural conditions. We expect that the adapted methods will enable more detailed studies on the development and maintenance of TRA in endemic populations.

## Publicaties / **Publications**

1. Van der Kolk, M., S. J. de Vlas, and R. W. Sauerwein. 2006. Reduction and enhancement of *Plasmodium falciparum* transmission by endemic human sera. *Int J Parasitol* 36:1091.
2. Bousema, J. T., W. Roeffen, M. van der Kolk, S. J. de Vlas, M. van de Vegte-Bolmer, M. J. Bangs, K. Teelen, L. Kurniawan, J. D. Maguire, J. K. Baird, and R. W. Sauerwein. 2006. Rapid onset of transmission-reducing antibodies in javanese migrants exposed to malaria in Papua, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 74:425.
3. Van der Kolk, M., S. J. De Vlas, A. Saul, M. van de Vegte-Bolmer, W. M. Eling, and R. W. Sauerwein. 2005. Evaluation of the standard membrane feeding assay (SMFA) for the determination of malaria transmission-reducing activity using empirical data. *Parasitology* 130:13.
4. Boudin, C., M. Van Der Kolk, T. Tchuinkam, C. Gouagna, S. Bonnet, I. Safeukui, B. Mulder, J. Y. Meunier, and J. P. Verhave. 2004. *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity under conditions of low and high endemicity in Cameroon. *Parasite Immunol* 26:105.
5. Van der Kolk, M., A. E. Tebo, H. Nimpaye, D. N. Ndombol, R. W. Sauerwein, and W. M. Eling. 2003. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaounde, Cameroon, is seasonal and age-dependent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97:375.
6. Nimpaye, H., M. Van der Kolk, D. Fontenille, and C. Boudin. 2001. Le paludisme urbain à Yaoundé (Cameroun) en 2000. Etude entomologique dans le quartier central "Dakar". *Bulletin OCEAC* 34:11.
7. Verschoor, E. J., P. Mooij, H. Oostermeijer, M. van der Kolk, P. ten Haaft, B. Verstrepen, Y. Sun, B. Morein, L. Akerblom, D. H. Fuller, S. W. Barnett, and J. L. Heeney. 1999. Comparison of immunity generated by nucleic acid-, MF59-, and ISCOM-formulated human immunodeficiency virus type 1 vaccines in *Rhesus* macaques: evidence for viral clearance. *J Virol* 73:3292.
8. Mooij, P., M. van der Kolk, W. M. Bogers, P. J. ten Haaft, P. Van Der Meide, N. Almond, J. Stott, M. Deschamps, D. Labbe, P. Momin, G. Voss, P. Von Hoegen, C. Bruck, and J. L. Heeney. 1998. A clinically relevant HIV-1 subunit vaccine protects rhesus macaques from in vivo passaged simian-human immunodeficiency virus infection. *Aids* 12:F15.
9. Krul, M. R., E. J. Tijhaar, J. A. Kleijne, A. M. Van Loon, M. G. Nievers, H. Schipper, L. Geerse, M. Van der Kolk, P. A. Steerenberg, F. R. Mooi, and W. Den Otter. 1996. Induction of an antibody response in mice against human papillomavirus (HPV) type 16 after immunization with HPV recombinant Salmonella strains. *Cancer Immunol Immunother* 43:44.
10. Vandebriel, R. J., M. van der Kolk, L. Geerse, P. A. Steerenberg, and M. R. Krul. 1995. A helper T-cell epitope of the E7 protein of human papillomavirus type 16 in BALB/c mice. *Virus Res* 37:13.
11. Van der Kolk, M., S. J. de Vlas, M. van de Vegte-Bolmer, W. M. C. Eling, C. Boudin, and R. W. Sauerwein. Quantification of *Plasmodium falciparum* transmission reducing activity by the standard membrane feeding assay. (*In preparation.*)
12. Gouagna, L. C., M. van der Kolk, W. Roeffen, J. P. Verhave, W. M. C. Eling, R. W. Sauerwein, and C. Boudin. Role of heat-labile serum factor or host complement in the inhibition of *Plasmodium falciparum* sporogonic stages in *Anopheles stephensi* by gametocyte carriers' serological factors. *Parasitology* (*In press.*).

