

Molecular tools for the diagnosis of malaria and monitoring of parasite dynamics under drug pressure

Thesis by: **Petra Mens**

Promotor: Prof. dr. P.A. Kager

Academic Medical Centre of the University of Amsterdam
Amsterdam, The Netherlands

Date: 18 september 2008

Summary and Samenvatting

The laboratory diagnosis of malaria is usually done by microscopic examination of blood samples for the detection of *Plasmodium* parasites. There are several factors that influence the sensitivity as well as the specificity of microscopic examination, for example the experience of the microscopist and the level of infection (parasitaemia) of the patient. Several adaptations to microscopic examination and alternative technologies to circumvent the use of a microscope have been developed and are discussed in the general introduction **chapter 1** of this thesis.

Technologies based on molecular biology have been used in routine diagnosis for several parasitic diseases, most of them based on the recognition of DNA. With Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), which is based on

the detection of RNA, it is possible not only to quantify parasite load but also to detect and quantify stage specific targets. Previously, NASBA technology for the identification of *Plasmodium falciparum* and its gametocyte specific pfs25 target was described. **Chapter 2** describes the development and evaluation of assays for the detection and quantification of the three other disease causing *Plasmodium* species; *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium malariae*. These assays have shown to specifically and reliably identify and quantify the different species making the molecular diagnostic arsenal for malaria infections complete. In addition, these assays can be used in for example epidemiological studies. **Chapter 3** describes the development and evaluation of an assay for the specific detection of *P. vivax* gametocytes. *P. vivax* is generally considered a parasite that gives rise to only mild disease but evidence is growing that it could also have a more malignant disease outcome. In this light the possibilities to gain more insight in transmission patterns of this species are relevant and the developed Pvs25 NASBA serves this purpose. Interestingly, the analysis shows that not all samples containing *P. vivax* parasites harbour its gametocytes. Whether this is due to late maturation of gametocytes, to a strain specific phenomenon or limitations of the developed assay, remains at present unclear and should be studied more extensively in the future.

NASBA not only allows analysis of samples in a setting of patient care but is also a valuable tool in research. The high sensitivity allows for detection of parasites below the microscopic threshold. The advantage of this low threshold is demonstrated in **chapter 4** in which the clinical and parasitological response to sulfadoxin-pyrimethamine treatment in Kenyan children was assessed. In this study a positive NASBA count on day 7 after the initiation of treatment predicted late treatment failure much better than expert microscopy. Lack of microscopic sensitivity forces many studies on the assessment of the efficacy of first-line antimalarials to follow patients for 28 days in order to assess late treatment failure. The implementation of assays such as NASBA could reduce follow up time dramatically.

The high sensitivity of NASBA and its capacity to detect specific stages of the parasite also proved to be useful in the assessment of gametocyte development when patients were treated with an artemisinin drug. Although artemisinin combination treatments (ACTs) have shown to rapidly clear asexual stages of *Plasmodium* from the blood of infected patients and no difference could be found in the efficacy of artemether-lumefantrine (AL) and dihydroartemisinin-piperaquine (DP), a clear difference between both drugs could be observed when the presence of gametocytes were analyzed during follow-up after treatment (**chapter 5**). In this study patients treated with DP harboured a higher proportion of gametocytes compared to AL treated patients. These findings could have implications in malaria control and should be taken into account when malaria control programs are developed.

Above studies show the possibilities to use NASBA in research and possibly also in routine patient care. In spite of the higher sensitivity of NASBA compared to microscopy it is however the question if implementation of NASBA, particularly for endemic areas, should be favored. The additional value of molecular diagnostics in comparison with other routine diagnostic procedures, rapid diagnostic tests (RDT) and microscopy, was studied in two endemic areas with different transmission intensity (**chapter 6**). NASBA detected more malaria patients than RDTs and microscopy, both in high and in low endemic areas. Moreover, the study showed that in high endemic areas the added value of molecular diagnostics is small because a very high percentage of patients is infected. In these areas good microscopy or, if that is not possible, use of RDT methods is a good alternative. In low endemic areas the added value is much higher and implementation of NASBA could be an improvement in patient care.

Although NASBA is an isothermal reaction that in principle only uses a simple water bath at 41 °C, it needs modern equipment that needs and consumes electricity and requires a sophisticated laboratory for the detection of the product. In many malaria endemic countries these prerequisites are not available, which is one of the reasons why the implementation of NASBA as a diagnostic tool is

hampered. A simplification of the technology and the read- out system could aid the implementation of molecular diagnostics in endemic areas. With the application of Nucleic Acid Lateral Flow Immuno Assay (NALFIA) technology a start has been made towards the simplification of the read out system (**chapter 7**). NALFIA is fast and sensitive and was evaluated in a peripheral out-patient clinic in Kenya where it was shown to work under field conditions. The current NALFIA detects DNA therefore this technology is not immediately applicable for NASBA. Once the system is translated to a NASBA detection system it will make molecular diagnostics accessible for endemic settings as well.

Samenvatting

De laboratoriumdiagnose van malaria berust gewoonlijk op microscopisch onderzoek van bloed waarin *Plasmodium* parasieten gedetecteerd kunnen worden. Er zijn verschillende factoren die de gevoeligheid en de specificiteit van microscopisch onderzoek kunnen beïnvloeden zoals de ervaring van de microscopist en de mate van infectie (parasitemie) van de patiënt. Verscheidene aanpassingen om het microscopisch onderzoek te verbeteren als ook alternatieve technologieën die helemaal geen gebruik maken van microscopie zijn in de laatste jaren ontwikkeld en worden besproken in de algemene inleiding (**hoofdstuk 1**) van dit proefschrift.

De technologieën die op moleculaire biologie gebaseerd zijn worden inmiddels gebruikt in de routinediagnose van diverse parasitaire ziekten. De meeste testen zijn gebaseerd op de detectie van DNA. Nucleic Acid Sequence Based Assay (NASBA) detecteert RNA waardoor het niet alleen mogelijk is om te kwantificeren maar ook stadiumspecifieke vormen van de malaria parasiet aan te tonen. Toepassing van NASBA voor de identificatie en kwantificering van *Plasmodium falciparum* is reeds beschreven evenals ontwikkeling van een specifieke test voor detectie van *P. falciparum* gametocyten, gebaseerd op het pfs25 coderend RNA.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling en de evaluatie van testen voor de detectie en kwantificering van de drie andere ziekte veroorzakende *Plasmodium* soorten; *P. vivax*, *P. malariae* en *P. ovale*. Deze testen zijn gevoelig en specifiek en kunnen de verschillende soorten kwantificeren. Hiermee maken deze testen het arsenaal voor de diagnostiek van de verschillende malaria soorten compleet. Daarnaast kunnen deze testen in bijvoorbeeld epidemiologische studies worden gebruikt. **Hoofdstuk 3** beschrijft de ontwikkeling en de evaluatie van NASBA voor de specifieke detectie van *P. vivax* gametocyten. *P. vivax* is lang gezien als de veroorzaker van slechts milde symptomen van malaria. Recente publicaties laten echter zien dat *P. vivax* infecties ook een ernstiger beloop kunnen hebben.

Mede in dit licht bezien is het belangrijk een beter inzicht te verkrijgen in de transmissiepatronen van *P. vivax*. Daarom is er op basis van het Pvs25 coderend RNA een kwantitatieve NASBA ontwikkeld die specifiek de *P. vivax* gametocyten kan aantonen. Opmerkelijk is dat de analyse van de bloedmonsters uitwijst dat niet alle *P. vivax* bevattende monsters ook *P. vivax* gametocyten bevatten. Of dit toe te schrijven is aan late ontwikkeling van gametocyten of aan beperkingen van de ontwikkelde test, of dat het mogelijk een stam of regio-specifiek fenomeen is, zal in verder moeten worden bestudeerd.

NASBA is niet alleen een geschikte methode voor de diagnostiek van malaria, maar is ook een waardevol hulpmiddel in onderzoek. De hoge gevoeligheid van de test maakt het mogelijk om parasieten aan te tonen onder de detectiedrempel van microscopie. De lage detectielimiet van NASBA heeft het mogelijk gemaakt om de parasitemie gedurende de behandeling met sulfadoxine-pyrimethamine in Keniaanse kinderen te vervolgen (**hoofdstuk 4**). In deze studie had dat een positieve NASBA uitslag op dag 7 na de start van behandeling, een voorspellende waarde voor het falen van behandeling op dag 28. In vergelijking met microscopie scoorde de NASBA beduidend beter. Het gebrek aan gevoeligheid van microscopie dwingt vele studies naar de doeltreffendheid van eerstelijns anti-malaria middelen om patiënten tot dag 28 of langer te vervolgen om hiermee laat behandelingsfalen uit te sluiten. De implementatie van testen zoals NASBA zou de vervolgtijd mogelijk drastisch kunnen verminderen.

De gevoeligheid van NASBA en de mogelijkheid om specifieke stadia van de parasiet aan te tonen hebben hun nut getoond in de analyse van ontwikkeling van gametocyten in patiënten die behandeld zijn met artemisinine combinatie therapie (ACT). Terwijl er geen verschil te zien is in de effectiviteit van artemisinine-lumefantrine (AL) en dihydroartemisinine-piperaquine (DP) en beide medicijnen snel asexuele parasieten klaren, is er een duidelijk verschil te zien als er naar gametocyten gekeken wordt gedurende en na behandeling (**hoofdstuk 5**). Het percentage patiënten dat gametocyten heeft na behandeling

is groter in de groep die is behandeld met DP. Deze bevindingen zouden implicaties kunnen hebben voor de beheersing van malaria en moeten in overweging worden genomen als nieuwe malaria controleprogramma's worden opgezet.

Bovenstaande studies pleiten voor het gebruik van NASBA in onderzoek en mogelijk ook in diagnostiek. Ondanks de hogere gevoeligheid van de techniek is het de vraag of implementatie van NASBA in de diagnostiek, met name in endemische gebieden, een overtuigende winst oplevert. De additionele waarde van moleculaire diagnostiek in vergelijking met andere routine diagnostiek, zoals teststripjes (rapid diagnostic tests, RDT) en microscopie, is bestudeerd in twee verschillende endemische gebieden met een verschillende transmissie intensiteit (**hoofdstuk 6**). Dit liet zien dat NASBA in zowel hoog endemische als in laag endemische gebieden meer patiënten met malaria identificeert. Daarnaast liet de studie ook zien dat in een hoog endemisch gebied de toegevoegde waarde van moleculaire diagnostiek gering is doordat een zeer hoog percentage patiënten geïnfecteerd is en in deze gebieden goede microscopie, of daar waar dat niet mogelijk is RDT, goed te gebruiken methodes zijn. In laag endemische gebieden is de toegevoegde waarde veel groter en zal implementatie van NASBA een verbetering van de patiëntenzorg kunnen opleveren.

In principe is voor de uitvoering van NASBA slechts een waterbad nodig dat verwarmd is tot 41 °C maar voor de detectie van het NASBA product wordt gebruik gemaakt van apparatuur die elektriciteit en een geavanceerd laboratorium vereist. In veel malaria endemische gebieden zijn deze voorzieningen niet voorhanden en dit houdt mede de implementatie van NASBA als diagnostisch hulpmiddel tegen. Een vereenvoudiging van de technologie en de afleesmethoden zou implementatie mogelijk dichterbij brengen. Met behulp van Nucleic Acid Lateral Flow Immuno Assay (NALFIA) is een begin gemaakt met de vereenvoudiging van de afleestecnologie (**Hoofdstuk 7**). NALFIA is snel en gevoelig en is geëvalueerd in een perifeer ziekenhuisje in Kenia waar deze

technologie toepasbaar bleek onder veld condities. De huidige NALFIA is gebaseerd op DNA-detectie waardoor deze technologie niet meteen toepasbaar is voor NASBA die immers RNA detecteert. Een vertaalslag naar NASBA technologie zou ook moleculaire diagnostiek in de lokale ziekenhuizen toegankelijk kunnen maken.

