

## Summary

Interrupting malaria transmission worldwide is one of the greatest challenges for international health and development communities. Even though substantial progress has been made in reducing malaria prevalence, further scaling up of control with currently available knowledge, tools and strategies will most likely fall short of eliminating malaria in most endemic settings. This is partly due to constant threats to current progress, such as emergence of antimalarial drug resistance and vector mosquito resistance to insecticides. Consequently, need for more potent tools to contain dissemination of resistant parasites and accelerated development of vaccines that can impact on malaria incidence, disease, and death remains a high priority.

In this thesis, I evaluate currently available and experimental treatment and vaccination strategies that have the potential to support malaria control, elimination, and eradication efforts now and in the future. The work described in this thesis can be grouped into three main sections.

- A. Improving access and accuracy of diagnosis using malaria rapid diagnostic tests, a current strategy
- B. Mosquitocidal additions to current antimalarial treatment to prevent transmission, a near future strategy
- C. Protection against malaria by inoculation of whole sporozoites, a future strategy

In **Section A** we show that malaria rapid diagnostic tests (RDTs) can support rational treatment of malaria, as they provide parasite based diagnosis in presumptive treatment settings and are an attractive easy-to-use alternative to microscopy. In **Chapter 2** we observed an immediate and evident effect of a policy change by the Tanzanian government, comprising the provision of RDTs and advice to restrict antimalarial treatment to RDT-positive individuals. There was a significant reduction in antimalarial prescriptions after RDT implementation in two district hospitals situated in low to very-low malaria endemic areas in Tanzania. In **Chapter 3** we show that this reduction was also observed in other studies, particularly those where RDTs were introduced in presumptive treatment settings, but that the advantages of RDT implementation are harder to define when RDTs are introduced in settings that have used microscopy examination of blood smears. Furthermore, we highlight the World Health Organization's (WHO) initiative *T3: Test. Treat. Track*, which centres on the use of RDTs to address the widespread problem of poor access to diagnostic testing and antimalarial treatment. We argue that the biggest challenge in RDT implementation will be to provide adequate and sustained supplies of RDTs and appropriate training to all health workers in endemic areas.

In the **Section B** we present an alternative approach to prevent post-treatment malaria transmission. The transmission of malaria parasites from humans to mosquitoes (and subsequently to other humans) depends on the presence of mature sexual parasite forms (gametocytes) in the peripheral blood. Gametocytes are relatively insensitive to current first line antimalarial drugs that therefore need to be supported by specific transmission-blocking drugs. The search for malaria transmission-blocking drugs has so far focused on drugs that clear gametocytes. We discovered that ivermectin (IVM, a drug widely used against onchocerciasis) can prevent post-treatment malaria transmission in an unconventional way: by killing the vector, the *Anopheles* mosquito, instead of killing the gametocyte. In animal studies described in **Chapter 4** we discovered a pronounced but short-lived mosquitocidal effect of IVM. In **Chapter 5** we confirm these findings in humans by performing a

double-blind, placebo-controlled trial in Burkina Faso, in which we show that the combination of IVM with the current first line antimalarial drugs is safe and significantly reduces the survival of malaria-transmitting *Anopheles* mosquitoes. The mosquitocidal effect of one and two doses of IVM in combination with first line antimalarial drugs resulted in 27% and 35% reductions, respectively, in estimated malaria transmission potential during the first week after initiation of treatment. We argue that IVM can be recommended for malaria control in the near future, but that further studies must be conducted to provide definitive evidence of its role in any type of malaria control strategy. The ultimate evidence will come from cluster-randomized community trials with single or repeated IVM mass drug administration preferably with addition of mass drug administration of first line antimalarial drugs.

In the **Section C** we describe two controlled human malaria infection studies in which we immunized malaria naive volunteers under chloroquine chemoprophylaxis with *Plasmodium falciparum* sporozoites (CPS). In **Chapter 6** we assessed the life-cycle stage-specificity of CPS-induced protection and show that CPS immunization does not protect against an intravenously administered blood-stage challenge infection. The absence of protection against *P. falciparum*-infected erythrocytes indicates that CPS immunization only provides functional immunity against parasite liver-stages, emphasizing the need for a 100% effective CPS liver-stage immunization if this model is to be translated into an actual vaccine. In **Chapters 7 and 8** we determined the safety and tolerability of intradermal administration of cryopreserved *P. falciparum* sporozoites to volunteers taking chloroquine chemoprophylaxis, and its protective efficacy against infectious mosquito bites. We show that the current intradermal immunization regimen is safe and well tolerated, although it did not confer protection against infectious mosquito bites. This is in contrast to previous CPS studies in which volunteers were protected against infectious mosquito bites after CPS immunization. We believe that differences in efficiency of administration and infectivity of sporozoites between the regular CPS immunization and the currently used intradermal injections are likely responsible for the observed differences.

Each of the treatment and vaccination strategies described in this thesis has the potential to make a significant contribution to malaria elimination (and eventually eradication). To achieve malaria elimination, i) access to highly sensitive and accurate diagnosis is essential in order to find all malaria-infected individuals, and diagnostics should be suitable for mass screening, ii) parasite positive individuals should be treated and onwards transmission should be prevented, and iii) gains should be sustained and herd immunity should be induced in low endemic and elimination areas. Strategies described in this thesis, could be applied into this three-step approach: i) RDTs could increasingly be used to identify geographical clusters of malaria infections ii) that could then be targeted with IVM and first line antimalarial drugs in a mass drug administration approach to prevent the spread of (resistant) parasites to surrounding populations, and eventually iii) a whole-sporozoite vaccine (once developed) could protect the population against future malaria outbreaks.

The future of malaria control and eradication efforts will be highly dependent on how well the scientific and public health communities, policy makers and local governments can work together to extend the effective life span of our existing tools while discerning new interventions that interrupt the complex life cycle of *Plasmodium* parasites.

## Samenvatting

Het terugdringen van malariatransmissie wereldwijd is één van de grootste uitdagingen voor de internationale gezondheidszorg. Hoewel er aanzienlijke vooruitgang is geboekt, zullen de momenteel beschikbare kennis, middelen en strategieën in de meeste endemische gebieden waarschijnlijk niet leiden tot eliminatie van malaria. Dit is deels te wijten aan de toenemende resistentie van *Anopheles*-muggen tegen insecticiden en de verminderde gevoeligheid van de *Plasmodium*-parasiet voor diverse antimalariamiddelen. Om de verspreiding van resistente *Plasmodium*-parasieten tegen te gaan, zullen krachtigere middelen nodig zijn. Ook hebben de ontwikkeling en distributie van een werkzaam vaccin dat invloed heeft op malaria-incidentie, -ziektelast, en -mortaliteit hoge prioriteit.

In dit proefschrift evalueer ik momenteel beschikbare en experimentele behandelings- en vaccinatiestrategieën die malariabeheersing, -eliminatie, en -eradicatie nu en in de toekomst zouden kunnen ondersteunen. Mijn proefschrift bestaat uit drie delen.

- A. Verbetering van de beschikbaarheid en nauwkeurigheid van diagnostiek met behulp van malaria-sneltesten, een momenteel toegepaste strategie
- B. Toevoeging van muggendodende middelen aan de bestaande malariabehandeling om transmissie via de mug te voorkomen, een strategie voor de nabije toekomst
- C. Bescherming tegen malaria door inoculatie met sporozoïeten, een strategie voor de toekomst

In **Deel A** laten wij zien dat malaria-sneltesten (rapid diagnostic tests, RDTs) kunnen bijdragen aan een rationele behandeling van malaria. In gebieden waar men uitsluitend behandelde op basis van klinische symptomen maakt een RDT het mogelijk om de diagnose malaria te stellen door detectie van specifieke *Plasmodium*-antigenen. In **Hoofdstuk 2** zagen wij een direct effect van een beleidswijziging van de Tanzaniaanse overheid, waarbij er RDTs werden verstrekt aan ziekenhuizen en malariabehandeling alleen mocht worden gestart na een positieve RDT-uitslag. Na deze beleidswijziging verminderde het aantal voorgeschreven antimalariamiddelen aanzienlijk in de twee regionale ziekenhuizen waar onze observatie plaatsvond. In **Hoofdstuk 3** tonen wij dat deze trend ook is waargenomen in andere studies, met name daar waar men voorheen uitsluitend behandelde op basis van klinische symptomen. Invoering van RDTs blijkt echter minder effect te hebben indien microscopische diagnose van malaria reeds plaatsvond. Ook belichten wij het *T3: Test, Treat, Track* initiatief van de Wereldgezondheidsorganisatie dat zich richt op het gebruik van RDTs. Wij zijn van mening dat adequate en permanente bevoorrading met RDTs alsmede een gedegen opleiding voor al het gezondheidszorgpersoneel de grootste uitdagingen vormen voor RDT-implementatie in endemische gebieden.

In **Deel B** tonen wij een nieuwe manier om de transmissie van parasieten tussen mens en mug na standaard malariabehandeling te verhinderen. Deze transmissie is het gevolg van de aanwezigheid van gametocyten (seksuele stadia van de parasiet) in humaan bloed. Gametocyten zijn relatief ongevoelig voor eerstelijns antimalariamiddelen die daarom ondersteund moeten worden met middelen die transmissie voorkomen. De zoektocht naar deze transmissieblokkerende middelen heeft zich tot op heden gericht op middelen die gametocyten doden. Wij hebben aangetoond dat ivermectine (IVM, een geneesmiddel dat op grote schaal wordt gebruikt voor behandeling van rivierblindheid) malariatransmissie op onconventionele wijze kan verhinderen: IVM doodt de vector van de malariaparasiet, de *Anopheles* mug, in plaats van de gametocyt. Uit dierstudies beschreven in

**Hoofdstuk 4** blijkt dat IVM een kortdurend maar evident muggendodend effect heeft. In **Hoofdstuk 5** observeerden wij in een dubbelblinde, placebo-gecontroleerde trial in Burkina Faso eenzelfde effect in de mens. In deze trial laten wij zien dat de combinatie van IVM met de huidige eerstelijns antimalariamiddelen veilig is en de overleving van *Anopheles* muggen significant verkleint. Het muggendodende effect van één en twee doses IVM resulteerde in dalingen van respectievelijk 27% en 35% van het malariatransmissiepotentieel tijdens de eerste week na start van behandeling. Wij zijn van mening dat deze combinatietherapie in de nabije toekomst kan worden gebruikt voor de bestrijding van malaria. Er dienen echter aanvullende studies te worden uitgevoerd om de precieze rol van IVM in elk type malariabeheersingsstrategie te bepalen. Het definitieve bewijs zal moeten worden geleverd door cluster-gerandomiseerde community trials waarin een eenmalige of herhaalde dosis IVM bij voorkeur met een eerstelijns antimalariamiddel aan de hele populatie wordt gegeven.

In de **Deel C** beschrijven wij twee gecontroleerde humane malaria-infectiestudies waarin gezonde proefpersonen terwijl zij chloroquine innemen, worden blootgesteld aan *Plasmodium falciparum* sporozoïeten via muggenbeten (de conventionele CPS-immunisatie) of via injecties (een alternatieve wijze van CPS-immunisatie). Op deze manier proberen wij hen immuun te maken voor een nieuwe malaria-infectie. In **Hoofdstuk 6** laten wij zien dat CPS-immunisatie wél bescherming biedt tegen met sporozoïeten geïnfecteerde muggenbeten, maar niet tegen intraveneus toegediende bloedstadiumparasieten. Het ontbreken van bescherming tegen deze bloedstadiumparasieten duidt erop dat CPS-immunisatie alleen bescherming biedt tegen de leverstadia van de parasiet. In **Hoofdstuk 7 en 8** hebben wij bekeken of proefpersonen die intradermaal sporozoïeten krijgen toegediend en chloroquine innemen, immuun worden voor infectieuze muggenbeten. We concluderen dat het huidige intradermale immunisatiebeleid veilig is en goed verdragen wordt. Het biedt echter geen bescherming tegen infectieuze muggenbeten, in tegenstelling tot eerdere CPS-immunisatiestudies waarin proefpersonen immuun werden. Wij denken dat het verschil tussen de conventionele CPS-immunisatie en de intradermale injecties te verklaren is door een andere toedieningswijze en de mate waarin sporozoïeten infectieus zijn.

Elk van de behandelings- en vaccinatiestrategieën beschreven in dit proefschrift heeft de potentie om een belangrijke bijdrage te leveren aan malaria-eliminatie (en uiteindelijk eradicatie). Om malaria-eliminatie te bereiken, i) is toegang tot zeer gevoelige en nauwkeurige diagnostiek essentieel om alle malariageïnfecteerde individuen op te sporen en moet diagnostiek geschikt zijn voor massale screening, ii) dienen malariageïnfecteerde individuen te worden behandeld en moet verdere transmissie worden voorkomen, en iii) dient gemaakte progressie te worden gewaarborgd en immuniteit op populatieniveau te worden opgewekt in laagendemische gebieden en eliminatiegebieden. De strategieën beschreven in dit proefschrift kunnen worden toegepast in deze drietraps-aanpak: i) RDTs kunnen worden gebruikt om geografische clusters van malaria-infecties op te sporen ii) waar vervolgens zoveel mogelijk individuen met IVM en eerstelijns antimalariamiddelen worden behandeld om verspreiding van (resistente) parasieten naar omliggende populaties te voorkomen en iii) uiteindelijk zou een vaccin gebaseerd op sporozoïeten (eenmaal ontwikkeld) de populatie kunnen beschermen tegen toekomstig uitbraken van malaria.

De toekomst van malariabeheersings- en eradicatie-inspanningen zal sterk afhangen van de mate waarin wetenschap, volksgezondheidsorganisaties, beleidsmakers en lokale overheden samenwerken om de levensduur van bestaande beheersingsmaatregelen te verlengen en nieuwe interventies te ontwikkelen.

