

Epidemiologia clínica e molecular da malária por *Plasmodium falciparum* na bacia Amazônica brasileira: implicações para o programa nacional de controle da malária

Centros:

- Hospital das Clínicas Dr. Wilson Franco, Boa Vista, Roraima, Brasil
- Pronto Atendimento Cosme e Silva, Boa Vista, Roraima, Brasil
- Hospital Délio de Oliveira Tupinambá, Pacaraima, Roraima, Brasil

Número de registro do protocolo/ versão/data: versão 1.0, 22 de fevereiro de 2021

Investigador principal: André Machado de Siqueira MD PhD;

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil;

Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP:21040-360; Tel: +55(21) 96722-2701

Co-investigador(es):

Joseli de Oliveira Ferreira, Laboratório de Imunoparasitologia, IOC/Fiocruz

Jaime Louzada, Universidade Federal de Roraima

Ananias Escalante, Temple University

Anna Caroline Campos Aguiar, Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP)

Prabin Dahal, WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN), Oxford University

Sonia Morgado Goncalves, Wellcome Sanger Institute

Kim Johnson, Wellcome Sanger Institute

Coordenador: José Moreira, INI/Fiocruz

Instituições participantes: INI/Fiocruz, IOC/Fiocruz, UFRR, SESAU

Datas de estudos planejadas: junho/2021 a Out/2022

Patrocinador: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz)

Financiador: Ministério da Saúde, Brasil; Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Térreo; Brasília/DF, CEP: 70058-900

Equipe de desenvolvimento do protocolo:

Declaração de confidencialidade

Este documento contém informações confidenciais que não devem ser divulgadas a ninguém que não seja o patrocinador, a equipe do investigador, as instituições envolvidas, o comitê de ética relevante e as autoridades reguladoras.

Contrato do Investigador e Conflito de Interesses

“Eu li este protocolo e:

- Concordo em cumprir todas as disposições nele estabelecidas.
- Concordo em cumprir os princípios das Boas Práticas Clínicas (ICH/GCP).
- Concordo em cumprir com as normativas ético-regulatórias brasileiras.
- Declaro não possuir conflito de interesses.

Investigador principal

Assinatura do investigador principal

Data

Sinopse

Título do estudo:

Epidemiologia clínica e molecular da malária por *Plasmodium falciparum* na bacia Amazônica brasileira: implicações para o programa nacional de controle da malária

Acrônimo: Não se aplica

Desenho do estudo: Estudo observacional, prospectivo, com dois braços; o primeiro objetiva a avaliação da cinética da eliminação parasitária *in vivo* e *in vitro* e da presença de polimorfismos genéticos associados à diminuição do tempo de clareamento do *P. falciparum* em pacientes adultos, hospitalizados com malária aguda não complicada, tratados com comprimidos ASMQ FDC. O segundo braço do estudo visa estimar a prevalência de mutações na proteína *pfrp2/3* do *P. falciparum*.

Participantes do estudo: Pacientes sintomáticos com doença febril aguda e suspeita de malária falciparum

Tamanho da amostra: Braço I: $n=93$, Braço II: $n=370$

Tratamento e acompanhamento:

Braço I:

Os parâmetros clínicos, parasitológicos e moleculares serão monitorados ao longo de 42 dias para avaliar a eficácia do ASMQ FDC, administrado em comprimidos de alta dose (ou seja, contendo 100 mg de AS e 220 mg de cloridrato de MQ) e em comprimidos de baixa dose (ou seja, com 25 mg de AS e 55 mg de cloridrato de MQ).

Braço II:

Entrevistas clínicas, teste rápidos de diagnóstico baseados em HRP2 ou LDH, e microscopia ocorrerá na primeira visita.

Braço I:

Critérios de inclusão

- Homem ou mulher, ≥ 18 anos;
- Malária aguda não complicada por *P. falciparum* confirmada por gota espessa com formas assexuadas de *P. falciparum*;
- Densidade parasitária entre 500-100.000 / μ L de sangue no momento da triagem;
- Temperatura axilar $\geq 37,5$ ° C ou histórico de febre nas últimas 24 horas;
- Consentimento informado por escrito;
- Capacidade de deglutir medicação oral;
- Disposição e capacidade de cumprir o cronograma do estudo pelo período de duração do estudo.

Critérios de exclusão

- Presença de sinais gerais de perigo / malária falciparum complicada, de acordo com as definições da OMS 2015;
- Hematócrito $<25\%$ ou hemoglobina <8 g/dL na triagem;
- Infecção mista ou mono-infecção com outra espécie de *Plasmodium* detectada por microscopia;

- Presença de condições febris devido a outras doenças que não a malária (sarampo, infecção aguda do trato respiratório inferior, diarreia grave com desidratação);
- Presença de doenças crônicas ou graves subjacentes conhecidas (por exemplo: doenças cardíacas, renais, hepáticas, HIV / AIDS);
- Para mulheres com idade fértil [18-45 anos]: teste de gravidez positivo ou amamentação;
- Recebimento de medicamentos antimaláricos nas 48 horas anteriores;
- História de alergia ou contraindicação conhecida ao ASMQ;
- Incapaz de realizar o teste de gravidez;
- Esplenectomia prévia;

Braço II:

Critérios de inclusão

- Homem ou mulher, independente da idade;
- Malária sintomática *falciparum* confirmada por (i) gota espessa positiva com formas assexuadas de *P. falciparum*; ou (ii) teste rápido (TR) baseado em LDH, ou por (iii) reação em cadeia da polimerase (PCR), E (iv) TR baseado em HRP2;
- Temperatura axilar $\geq 37,5$ °C ou histórico de febre nas últimas 24 horas;
- Consentimento informado por escrito;
- Capacidade e vontade de cumprir os protocolos do estudo (pelo período de duração do estudo e cumprir o cronograma de visita do estudo).

Critérios de exclusão

- Já ter sido incluído no estudo previamente (Braço II);
- Não ter sido testado com TR baseado em HRP2;
- Recusar a coleta de amostra biológica.

Período de estudo planejado: junho de 2021 - outubro de 2022

Desfecho primário:

Estudar a epidemiologia clínica e molecular da infecção por malária *falciparum* em região endêmica da bacia amazônica brasileira, incluindo a cinética de clareamento do parasita, a presença de mutações associadas a diminuição do tempo de clareamento, a delação genética do *pfhrp2/3*, e seu impacto na resposta terapêutica e parasitológica

Desfechos secundários:

Braço I:

Quantificar a cinética do clareamento do parasita *in vivo* e *in vitro* usando um estimador padronizado de depuração do parasita entre pacientes adultos com malária *falciparum* não complicada, tratados com ASMQ

Eficácia corrigida e não corrigida por PCR de 42 dias definida como resposta clínica e parasitológica adequada (ACPR)

Tempo de clareamento da febre (ou seja, o tempo necessário para que a temperatura axilar reduza para abaixo de 37,5 °C e permaneça por, pelo menos, 24 horas)

Incidência de eventos adversos e eventos adversos graves nos primeiros 42 dias

Proporção de pacientes que relatam concluir um ciclo completo de ASMQ observado sem retirada do consentimento ou exclusão do estudo devido a um evento adverso grave relacionado ao medicamento

Prevalência de mutações de *Kelch13* de significado funcional conhecido

Identificação de fatores do hospedeiro que se correlacionam com a lenta eliminação do parasita

Proporção de pacientes com gametocitemia antes, durante e após o tratamento com ASMQ, avaliados na admissão, até o dia 14, estratificados pela presença de gametócitos na admissão

Sensibilidade *in vitro* do *P. falciparum* aos antimaláricos artesunatos (AS), mefloquina (MQ) e a combinação ASMQ

Avaliação do tempo de depuração *in vitro* do *P. falciparum*, após incubação com AS, utilizando o ensaio de sobrevivência em estágio de anel (RSA)

Avaliação dos níveis séricos de citocinas produzidas pelo hospedeiro durante a infecção pelo *P. falciparum*

Avaliação da resposta humoral a antígenos específicos para proteínas dos plasmódios e validar seu uso em regiões endêmicas de malária no Brasil

Estabelecer um biorepositório de amostras bem caracterizadas clinicamente para posterior desenvolvimento de ferramentas que auxiliem na identificação precoce de parasitas com resistência aos derivados da artemisinina

Braço II:

Prevalência de mutação nos genes da *pfhrp2/3* do *P. falciparum* entre indivíduos sintomáticos com infecção por *P. falciparum*

Densidade parasitaria, mensurada pela PCR quantitativa e/ou microscopia em pacientes com suspeita de *pfhrp2/3* falsamente negativos

Avaliação de anticorpos para *pfhrp2/3*

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A artemisinina e seus derivados são as drogas preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento do *P. falciparum* e, desde 2006, vem contribuindo para a redução significativa da morbiletalidade da malária em todo o mundo. O surgimento no sudeste da Ásia de parasitas que são parcialmente resistentes à artemisinina é motivo de grande preocupação. A disseminação de parasitas que carregam esses fenótipos resistentes para as Américas teria consequências deletérias para a eliminação da malária na região. Durante décadas, a resistência dos parasitos da malária aos medicamentos tem sido um dos maiores obstáculos para a eliminação da doença.

Nos últimos anos, com a crise política e econômica da Venezuela, a incidência de malária devido a falta de medicamentos para o tratamento e outras medidas de controle resultaram em um número crescente de casos na Venezuela e um aumento do fluxo migratório para os países fronteiriços, como é o caso do Brasil.

A vigilância de parasitas resistentes a antimaláricos nestas áreas é de grande importância para a conduta terapêutica, bem como para o planejamento de políticas de controle da malária. Posteriormente, esta proposta de pesquisa se concentra na descrição de um roteiro para uma vigilância eficaz da malária falciparum resistente à artemisinina na bacia amazônica brasileira.

A vigilância da sensibilidade dos plasmódios a antimaláricos e de grande importância para a conduta terapêutica e seus derivados são as drogas preconizadas pela OMS para o tratamento do *P. falciparum*. Entretanto, estudos clínicos vêm demonstrando uma demora no clareamento parasitário frente a artemisinina [Cheeseman et al. 2012; Takala-Harrison et al. 2013]. Este fenótipo tem sido associado a presença de polimorfismos no domínio hélice do gene kelch-13 (k13) de *P. falciparum* que podem ser usados como marcadores moleculares para o monitoramento do surgimento e propagação da resistência. Atualmente, nove polimorfismos de nucleotídeo único no gene pfk13 são validados como marcadores moleculares para a resistência da artemisinina: F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H e C580Y.

As taxas de eliminação de parasitas são afetadas pelos perfis de concentração sanguínea dos medicamentos, bem como pelas propriedades farmacodinâmicas. A imunidade e outros fatores como a função esplênica, idade, anemia e co-infecções também podem afetar o clareamento do parasita e devem ser investigadas.

Embora a resistência à artemisinina em *P. falciparum* esteja confinada a uma área geográfica relativamente pequena no sudeste asiático, é importante estabelecer em outras áreas os dados de remoção de parasitas de linha de base para os diferentes ACTs no setor público, para que as tendências possam ser seguidas prospectivamente nos países endêmicos da malária. As avaliações precisas da eliminação de parasitas nesse “sistema de alerta precoce” requerem amostragem frequente de sangue e contagem precisa, além da carga de trabalho adicional e a garantia de qualidade necessária de tais medidas de monitoramento que, sem dúvida, levantam sérios desafios operacionais. Poucos estudos investigam a presença de marcadores genéticos

associados a resistência a artemisinina e a diminuição no clareamento de parasitas na América Latina, onde os ACTs são utilizados há mais de 15 anos em algumas áreas.

Na Guiana, o alelo mutante C580Y foi encontrado [Chenet et al. 2016] mas, o estudo de haplótipos dos microssatélites franqueadores do gene *Pfk13* mostrou que este alelo possui um perfil diferente daqueles do Camboja, sugerindo que o seu surgimento na América do Sul correu de forma independente dos da Ásia [Wooton 2002] e há uma preocupação que esses parasitas mutantes se propaguem nos países vizinhos, incluindo no Brasil. Para obter dados de vigilância de linha de base para o surgimento ou disseminação da resistência à artemisinina na América Latina, estudaremos as taxas de clareamento de parasitas em resposta ao ASMQ FDC em áreas de baixa transmissão da malária na Amazônia brasileira. Informações abrangentes de vigilância nos países endêmicos da malária são fundamentais para gerar evidências sobre o surgimento da resistência à artemisinina e informar políticas baseadas em evidências para orientar os programas nacionais de controle da malária.

Os testes rápidos de diagnóstico (TR) oferecem um grande potencial para o diagnóstico imediato da malária, especialmente em regiões rurais, onde carece uma estrutura de laboratório eficaz e onde faltam técnicos qualificados para realizar as leituras microscópicas das lâminas. Os TR disponíveis atualmente são baseados em imunocromatografia de fluxo lateral e detectam antígenos do *Plasmodium* no sangue. Os antígenos alvo usados nos TR são: a *histidine rich protein 2* (HRP2), a desidrogenase láctica (LDH) e a aldolase. O HRP2 é uma proteína abundante expressa somente por *P. falciparum* e o alvo da maioria dos testes rápidos disponíveis em regiões onde predomina a infecção por *P. falciparum*. Apesar que os TR foram desenhados para reconhecer o antígeno HRP2, reação cruzada com outro antígeno da família HRP, nomeadamente o HRP3, poderão ocorrer. TR baseados em HRP2 tendem a ser mais sensíveis e estáveis ao calor do que os baseados em LDH ou na aldolase.

O primeiro caso relatado de *P. falciparum* com ausência de expressão genética da *pfhrp2/3* ocorreu em 2010 na bacia amazônica peruana, com estimativas de prevalência elevadas chegando a alcançar à 40% da população estudada. [Gamboa D et al. PLoS One 2010]. Viana e colaboradores avaliaram a prevalência de deleções genéticas da *pfhrp2/3* em uma amostra de conveniência de 6 centros em três estados da bacia amazônica brasileira (Acre, Rondônia e Pará) entre 2010 e 2012. Os isolados do Acre apresentaram maior proporção de deleção do *pfhrp2* (31.2%), seguido de uma prevalência de 3.3% dos isolados coletados em Rondônia. Não se observaram nenhum isolado com deleção para *pfhrp2* no Pará. Deleções para *pfhrp3* foram comuns nos três estados e variam de 18.3-50.9% [Viana GMR et al. PLoS One 2017].

A prevalência de parasitas com deleções para *pfhrp2/3* é bastante variável dependendo da região estudada, muita embora o rigor metodológico da maioria dos estudos não permitiu que o efeito observado tivesse poder suficiente para estimar o peso real da prevalência dessas mutações

nessas populações estudadas. Recentemente, um estudo da Eritreia, mostrou que a prevalência da dupla deleção *pfhrp2/3* foi bastante elevada (80%), necessitando de uma resposta urgente em termos da identificação das regiões onde o uso de TR baseados em HRP2 devem ser reconsiderados [Berhane A et al. EID 2018]. Até ao momento, não tem se conhecimento de ausência de expressão da LDH ou aldolase, pois esses alvos são enzima essenciais no metabolismo parasitaria e primordiais para a sobrevivência do parasita.

Diante deste cenário, a OMS recomenda aos países membros para realizarem estudos de vigilância molecular para avaliar a prevalência de deleção do *pfhrp2/3* nos indivíduos sintomáticos com suspeita de malária falciparum. O presente trabalho representa uma oportunidade impar para a avaliação da ocorrência de deleções nos genes *pfhrp2* e *phrp3* em pacientes sintomáticos com suspeita de malária falciparum atendidos em dois centros do estado de Roraima, e um deles em município vizinho a Venezuela. Antecipamos que os resultados deste estudo fornecerão ferramentas necessárias ao Ministério da Saúde, para guiar a atual política nacional de testagem com base em TR no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Estudar a epidemiologia clínica e molecular da infecção por malária falciparum em região endêmica da bacia amazônica brasileira, incluindo a cinética de clareamento do parasita, a presença de mutações associadas a diminuição do tempo de clareamento, a deleção genética do *pfhrp2/3*, e seu impacto na resposta terapêutica e parasitológica

2.2 Objetivos secundários

- Quantificar a cinética do clareamento do parasita *in vivo* e *in vitro* usando um estimador padronizado de depuração do parasita entre pacientes adultos com malária falciparum não complicada, tratados com ASMQ FDC
- Estimar a prevalência de mutação nos genes da *pfhrp2/3* do *P. falciparum* entre indivíduos sintomáticos com infecção por *P. falciparum*
- Mensurar a densidade parasitaria, mensurada pela PCR quantitativa e/ou microscopia em pacientes com suspeita de *pfhrp2/3* falsamente negativos
- Mensurar a eficácia clínica e parasitológica do comprimido ASMQ FDC em pacientes com 18 anos ou mais de idade, portadores de malária falciparum não complicada, determinando a proporção com falha no tratamento precoce, falha clínica tardia, falha parasitológica tardia ou resposta clínica e parasitológica adequada como indicadores de eficácia
- Diferenciar recrudescência de nova infecção por análise por reação em cadeia da polimerase (PCR)

- Avaliar a segurança e tolerabilidade dos comprimidos ASMQ FDC
- Avaliar as taxas de clareamento da febre dos comprimidos ASMQ FDC
- Avaliar a disseminação de marcadores genéticos da artemisinina (como as mutações *Kelch13*) e a resistência a medicamentos parceiros
- Medir a incidência e a duração do transporte de gametócitos em pacientes com malária sensível e antimalárica antes e após o tratamento com ASMQ
- Avaliar a sensibilidade *in vitro* do *P. falciparum* aos antimaláricos artesunatos, mefloquina e a combinação ASMQ
- Avaliar o tempo de depuração *in vitro* do parasito *P. falciparum*, após incubação com AS, utilizando o ensaio de sobrevivência em estágio de anel (RSA)
- Avaliar os níveis séricos de citocinas produzidas pelo hospedeiro durante a infecção pelo *P. falciparum*
- Avaliar a resposta humoral a antígenos específicos para proteínas dos plasmódios
- Estabelecer um biorepositório de amostras bem caracterizadas clinicamente para posterior desenvolvimento de ferramentas que auxiliem na identificação precoce de parasitas com resistência aos derivados da artemisinina

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Estudo observacional prospectivo com dois braços.

O primeiro braço (**Braço I**) realizará uma avaliação prospectiva de pacientes internados com malária falciparum não complicada, tratados com comprimidos ASMQ FDC, para analisar as alterações nas taxas de clareamento de parasitas e as respostas clínicas / parasitológicas ao tratamento diretamente observado. Os indivíduos com malária não complicada que atendam aos critérios de elegibilidade do estudo serão selecionados, incluídos e hospitalizados, por no mínimo três dias, para tratamento com ASMQ FDC e monitorados por 42 dias.

O acompanhamento consistirá em um horário fixo de *check-up* e exames clínicos e laboratoriais correspondentes. Com base nos resultados dessas avaliações, os pacientes podem ser caracterizados por ter uma lenta eliminação do parasita, o que sugere infecção resistente à artemisinina.

Além disso, os pacientes podem ser classificados como apresentando falha terapêutica (precoce ou tardia) ou resposta adequada.

A proporção de pacientes com falha terapêutica durante o período de acompanhamento será usada para estimar a eficácia dos medicamentos do estudo. A análise por PCR será usada para distinguir entre uma verdadeira recrudescência devido à falha do tratamento e episódios de reinfecção.

O outro braço deste projeto (**Braço II**), vai se delimitar numa **análise transversal** de pacientes sintomáticos com malária falciparum confirmada laboratorialmente. Participantes serão avaliados quanto a presença da dupla deleção nos genes de *pfhrp2/3* através de teste rápido (TR), microscopia, e exame molecular.

Participantes sintomáticos com malária falciparum serão rastreados através de TR HRP2 e pelo menos um método alternativo não baseado em HRP2 (TR LDH, microscopia ou PCR). Aqueles que consentirem serão entrevistados e solicitado a coleta de amostra biológicas. A frequência de falso negativos para o TR HRP2 na população estudada é o produto primário deste braço. A análise molecular de mutação em *pfhrp2/3* em amostras sanguíneas de suspeitos com TR HRP2 falso negativo é um dos objetivos secundários, bem como entre todos os indivíduos com malária aguda sintomática da população. De forma a maximizar os recursos disponíveis, será priorizado a testagem molecular da deleção das mutações nos indivíduos suspeitos de TR HRP2 falso negativo

3.2 Locais de estudo

O estudo será realizado em dois municípios distintos do estado de Roraima (Boa Vista e Pacaraima), na bacia amazônica brasileira. Os locais propostos foram selecionados com base nas informações epidemiológicas atuais, na presença de programas de pesquisa clínica estabelecidos e na viabilidade de fornecer um mapa da provável propagação da resistência.

3.3 Descrição dos centros participantes

- Hospital das Clínicas Dr. Wilson Franco

O Hospital das Clínicas Dr. Wilson Franco foi fundado em 2018, atendendo principalmente pacientes advindo das unidades de Boa Vista-RR, tem uma área física de 6 mil m². Conta com 200 leitos, 9 salas de cirurgia, 10 leitos de terapia intensiva.

- Pronto Atendimento Cosme e Silva

Unidade de saúde, em Boa Vista-RR responsável pelo atendimento de emergências médicas anexo ao hospital das clínicas Dr. Wilson Franco.

- Hospital Délio de Oliveira Tupinambá

Hospital de média complexidade localizado no município de Pacaraima, Roraima.

3.4 Momento e duração do estudo

A fase de recrutamento do estudo tem previsão de 12 meses após o início do recrutamento dos participantes.

A estimativa para iniciar o recrutamento dos participantes é em junho de 2021.

O treinamento precederá a execução do estudo em até 1 mês.

O gerenciamento e a análise de dados, a análise de amostras e a elaboração de relatórios devem levar cerca de 12 meses por centro de pesquisa.

3.5 População estudada

3.5.1 Descrição geral dos participantes do estudo

3.5.1.1 Braço I

indivíduos de ambos os sexos, com 18 anos ou mais, com malária aguda falciparum não complicada, e que aceitem internação hospitalar, são a população alvo do estudo. Todos os pacientes do estudo devem atender aos critérios de inclusão e exclusão.

Critério de inclusão

- Homem ou mulher, com 18 anos ou mais
- Malária aguda não complicada por *P. falciparum* confirmada por gota espessa positivo com formas assexuadas de *P. falciparum*
- Densidade parasitária entre 500-100.000 / uL de sangue no momento da triagem
- Temperatura axilar $\geq 37,5$ °C ou histórico de febre nas últimas 24 horas
- Consentimento informado por escrito
- Capacidade de deglutir medicação oral
- Capacidade e vontade de cumprir os protocolos do estudo (incluindo permanecer no hospital até que a parasitemia se torne indetectável) pelo período de duração do estudo e cumprir o cronograma de visita do estudo

Critério de exclusão

- Presença de sinais gerais de perigo ou malária falciparum grave, de acordo com as definições da OMS 2015 (i.e., dor abdominal intensa, icterícia, anemia grave, lesão renal aguda, sangramento, convulsão, hiperlactatemia)
- Hematócrito <25% ou hemoglobina <8 g/dL na triagem
- Infecção mista ou mono-infecção com outra espécie de *Plasmodium* detectada por microscopia
- Presença de condições febris devido a outras doenças que não a malária (sarampo, infecção aguda do trato respiratório inferior, diarreia grave com desidratação)
- Presença de doenças crônicas ou graves subjacentes conhecidas (isto é, doenças cardíacas, renais, hepáticas, HIV / AIDS);
- Para mulheres com idade fértil [18-45 anos]: teste de gravidez positivo ou amamentação
- Recebimento de medicamentos antimaláricos nas 48 horas anteriores;
- História de alergia ou contraindicação conhecida ao ASMQ
- Incapaz ou pouco disposto a fazer o teste de gravidez
- Esplenectomia prévia

3.5.1.2 Braço II

Indivíduos de qualquer idade, sintomáticos com malária falciparum

Critério de inclusão

- Homem ou mulher, independente da idade
- Malária sintomática por *P. falciparum* confirmada por (i) gota espessa positivo com formas assexuadas de *P. falciparum*; ou (ii) teste rápido (TR) baseado em LDH, ou por (iii) reação em cadeia da polimerase (PCR), E (iv) TR baseado em HRP2
- Temperatura axilar $\geq 37,5$ °C ou histórico de febre nas últimas 24 horas
- Consentimento informado por escrito
- Capacidade e vontade de cumprir os protocolos do estudo (pelo período de duração do estudo e cumprir o cronograma de visita do estudo)

Critério de exclusão

- Já ter sido incluído no estudo (Braço II)
- Não ter sido testado com TR baseado em HRP2
- Recusar a coleta de amostra biológica

3.6 Racional

A diretriz da OMS para excluir mulheres grávidas nos primeiros três meses no Braço I foi aplicada porque a artemisinina é contraindicada durante o primeiro trimestre. A faixa de parasitemia assexuada de 500-100.000/uL foi escolhida com base nos resultados do artigo de Stepniewska et al.[Flegg JÁ, Guérin PJ, Nosten F, et al. Malaria J 2013], que sugeriu que a proporção de gota espessa positivas no dia 3 seria uma ferramenta para avaliar os níveis populacionais de resistência à artemisinina e se a resistência à artemisinina é altamente improvável caso a proporção de pacientes com gota espessa positiva no dia 3 (72 horas) for <3% entre pacientes com densidades parasitárias de > 10.000 a <100.000 parasitas/uL na admissão. Outro motivo foi ajudar na comparação com outros estudos na região. Além disso, de acordo com algumas diretrizes de tratamento da malária, a alta parasitemia >100.000/uL é um indicador de potencial malária grave e deve ser tratada com terapia intravenosa.

4. Procedimentos do Braço I

Procedures	Sample (ml)	SCR	SCR	0H	4H	6H	8H	12H	18H	24H	30H	36H	42H	48H	52H	54H	60H	66H	72H	D7	D14	D21	D28	D35	D42	OTH
Inform consent	NA		x																							
Demographic/medical history	NA		x																							
Vital signs	NA		x	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	(N)
Weight	NA		x																							
Physical examination	NA		x	x																						
Symptom questionnaire	NA		x	x																						
Blood Smear	WB (0.1)	0.1 ml		0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	(0.1 ml)
CBC	EDTA (4)	2 ml		x																						(N)
DBS	Finger prick (0.2)			0.2 ml																						(N)
Biochemistry	serum (5)	5 ml		x																						(N)
Fe urine test	Heparin (5)			x																						(N)
Urine pregnancy test	Urine (10)	10 ml																								(N)
Total sample volume (ml)				14.3	0.1				9.3					9.3					9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	10 ml	
Treatment																										
ASMQ FDC administration	NA			x					x					x												
Rescue treatment				x					x					x												

ASMQ FDC artesunate-mefloquine fixed-dose combination; CBC complete blood count; DBS dried blood spot; EDTA ethylenediaminetetraacetic acid; OTH other non-scheduled study visit; WB whole blood; NA not applicable

4.1 Avaliação clínica

4.1.1 Triagem, consentimento informado e inclusão

Todos os pacientes que atenderem aos critérios básicos de inclusão (idade, febre ou histórico de febre, sintomas de malária, ausência de sinais de perigo de malária grave, ausência de desnutrição grave, gravidez) durante a triagem receberão um número consecutivo e serão avaliados em maior profundidade por equipe clínica. Deve-se tomar cuidado para detectar sinais precoces de doenças febris que não a malária, pois sua presença exigirá exclusão da avaliação. A condição de confusão mais frequente é uma infecção do trato respiratório inferior: tosse ou dificuldade em respirar, juntamente com respiração rápida, é um indicador de exclusão. Outras condições febris relativamente comuns são otite média, amigdalite, sarampo e abscessos. Os pacientes com essas condições não serão inscritos, mas devem ser tratados tanto para malária (se tiverem parasitemia) quanto para outra infecção, conforme apropriado. Pacientes com condições graves serão encaminhados imediatamente a um serviço de saúde apropriado para mais cuidados.

O formulário de registro de triagem será usado para registrar as informações gerais e as observações clínicas de cada paciente que está sendo rastreado. Se o paciente atender aos critérios clínicos, ele ou ela será examinado quanto à parasitemia. Um registro de triagem será mantido

O teste de triagem inclui um sangue anticoagulado com EDTA para:

- Uma contagem de parasitas de Giemsa ou Field corou filmes de sangue espessos e finos
- Hematócrito
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil

Depois que o paciente atender a todos os critérios de elegibilidade, ele será solicitado a consentir a participação no estudo.

Os pacientes que atenderem a todos os critérios de elegibilidade receberão um número de identificação pessoal (número do estudo do paciente) e receberão tratamento somente após o estudo ter sido totalmente explicado a eles e terem fornecido voluntariamente o consentimento informado. Qualquer pessoa que decida não participar do estudo será examinada, tratada e acompanhada pela equipe da unidade de saúde de acordo com o padrão de atendimento estabelecido pelo Ministério da Saúde.

Os participantes em potencial serão convidados a assinar e datar pessoalmente a versão mais recente aprovada do termo de consentimento livre e esclarecido (ou termo de assentimento, quando menor de idade) antes da execução de qualquer procedimento específico do estudo. O termo estará disponível em português e apresentado aos participantes em um idioma simples (ou seja, sem jargões médicos) acessível ao público em geral.

O consentimento informado por escrito será obtido por meio de assinatura datada dos participantes ou impressão digital (se não for possível escrever) e assinatura datada da pessoa que apresentou e obteve o TCLE.

4.1.2 Dados demográficos e histórico médico

Dados demográficos e epidemiológicos básicos (ou seja, sexo, idade, endereço, fatores de risco para malária) e um histórico médico completo serão registrados pela equipe do estudo.

4.1.3 Exame físico, sinais vitais e peso corporal

Um exame físico padrão será realizado por um membro qualificado da equipe de estudo. Peso, altura, pulso, pressão arterial, frequência respiratória, temperatura, tamanho do baço e do fígado serão registrados, se palpáveis.

O peso corporal será registrado no Dia 0 para o quilograma mais próximo em uma escala Salter. As balanças serão calibradas corretamente. A confiabilidade das escalas será verificada antes do início do estudo e verificada em intervalos regulares. O peso da triagem será utilizado para calcular a dose (número de comprimidos) a ser administrada.

A circunferência do braço médio esquerdo será medida, no ponto médio entre o cotovelo e o ombro, e será registrada até os 0,2 cm mais próximos.

A temperatura axilar será medida na triagem (Dia 0 antes da dosagem) e nos dias 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42. A temperatura será medida com um termômetro com precisão de 0,1 °C. A temperatura também será medida conforme indicado clinicamente. Se o resultado for <36,0 °C, a medição será repetida. O mesmo local de medição deve ser usado ao longo do estudo. A qualidade da técnica de tomada de temperatura e os termômetros devem ser avaliados regularmente. Os termômetros devem ser testados em banho-maria com temperatura conhecida antes do início do estudo e a intervalos regulares subsequentes.

4.1.4. Procedimentos durante a internação

No exame físico, a medição dos sinais vitais será realizada diariamente e a cada seis horas, mediante indicação. Um questionário de sintomas será respondido diariamente para ajudar a identificar eventos adversos. Um formulário de relatório de caso e um formulário de relatório de eventos adversos graves serão utilizados para registrar as informações gerais e as observações clínicas de cada paciente inscrito no estudo. Todos os pacientes devem ser hospitalizados por 3 dias ou dispostos a permanecer no hospital até que a parasitemia se torne indetectável. Os horários das consultas para as próximas visitas de estudo serão explicados claramente e será fornecido um cartão de acompanhamento com o número do estudo do paciente.

O dia em que um paciente está inscrito e recebe a primeira dose de ASMQ é designado como "Dia 0". Todo tratamento antimalárico será administrado por um membro da equipe de estudo sob supervisão. Se ocorrer vômito dentro de 30 minutos após a administração, a dose completa será repetida; se ocorreu entre 30 e 60 minutos após a administração, metade da dose será administrada. Se o paciente vomitar novamente, ele será retirado e receberá terapia de resgate conforme as diretrizes brasileiras de tratamento da malária. Tratamento auxiliar, como antipiréticos, será fornecido, se necessário, ao paciente pela equipe de estudo e documentado no formulário de relato de caso.

4.1.5 Acompanhamento

Após a alta, os pacientes serão acompanhados no dia 7 por:

- lâmina de sangue da malária
- Avaliações bioquímicas básicas, incluindo níveis de bilirrubina, ALT, AST, fosfatase alcalina e creatinina (sangue heparinizado)
- Medições de qPCR (anticoagulado por EDTA, 2 ml para adultos)
- Hemograma completo ou diferencial de leucócitos e Hct e Hb, se possível (anticoagulado por EDTA)
- Exame físico e registro de sintomas e eventos adversos

Após o dia 7, eles serão vistos semanalmente até o dia 42 para:

- lâmina de sangue da malária
- Hematócrito / Hb (sangue anticoagulado por EDTA)
- Dia 14, 28 e 42: medições de qPCR (anticoagulado por EDTA, 2ml para adultos)
- Dia 28: Avaliações bioquímicas básicas, incluindo níveis de bilirrubina, ALT, AST, fosfatase alcalina e creatinina (tubo heparinizado)
- Dia 28: hemograma ou diferencial de leucócitos e Hct e Hb, se possível (tubo anticoagulado com EDTA)
- Exame físico e registro de sintomas e eventos adversos

4.1.6 Janelas

O prazo para a visita no dia 7 é de + 3 dias e para as visitas do dia 14 a 42 é de -1 a +3 dias. Todos os esforços serão feitos para localizar os participantes para garantir o tratamento completo. Da mesma forma, o sucesso final do estudo se baseia na minimização de perdas no acompanhamento. Embora os pacientes sejam incentivados a retornar por conta própria para visitas agendadas de acompanhamento, é essencial que sejam tomadas providências antecipadas para localizar os pacientes em casa, se eles não comparecerem conforme solicitado. Isso requer obter instruções detalhadas para a casa durante a inscrição e os membros da equipe de estudo familiarizados com a comunidade serão responsáveis pelas visitas e meios de transporte para os pacientes. Serão realizadas visitas domiciliares para alertar os participantes do estudo e / ou levá-los às instalações médicas para concluir a visita de

acompanhamento. Uma bolsa será paga para cobrir as despesas relacionadas ao transporte e almoço do participante.

A programação do tratamento e o exame de acompanhamento apresentados neste protocolo devem ser seguidos para garantir a integridade dos dados. Pacientes que não retornam no dia 7, mas estão presentes nos dias 6 ou 8, ainda podem ser incluídos na análise. desvio do protocolo das janelas de tempo sugeridas, no entanto, deve ser evitado.

4.1.7 Visitas adicionais

Os pacientes serão aconselhados a retornar em qualquer dia durante o período de acompanhamento, se os sintomas retornarem e a não esperar pelo próximo dia agendado da visita. A reavaliação clínica será suficientemente completa para garantir a segurança do paciente e incluirá a avaliação não apenas de possíveis falhas no tratamento, mas também de possíveis reações adversas ao ASMQ. Os pacientes que apresentarem à clínica febre ou outros sintomas em dias não programados serão avaliados pelo médico do estudo. A temperatura será registrada e o esfregaço de sangue será feito para qualquer paciente com febre documentada (temperatura axilar $\geq 37,5$ C) ou com histórico de febre. Os pacientes serão tratados conforme indicado clinicamente.

No caso de uma paciente engravidar, em estudo, serão necessárias visitas adicionais aos 3 meses, 6 meses e 9 meses (após o nascimento), para permitir a documentação do resultado da gravidez.

4.1.8 História de uso de medicamentos

Todos os medicamentos prescritos ou vendidos sem receita e tradicionais usados nos últimos 7 dias serão registrados. Quaisquer alergias a medicamentos serão registradas.

4.1.9 Volumes de sangue

Os volumes sanguíneos para os testes obrigatórios do protocolo estão detalhados no cronograma do estudo (consulte o apêndice) e variam ligeiramente entre os locais, dependendo se os locais podem realizar todos os testes deste protocolo (ou seja, nem todos os locais serão capazes de fazer bioquímica, hemograma completo ou realizar a cultura do parasita *ex vivo*). Além disso, é provável que apenas uma minoria de pacientes desenvolva uma parasitemia recorrente e seja solicitada a fornecer mais amostras de sangue.

O volume máximo de sangue será de aproximadamente 14 ml.

4.1.10 Amostra de sangue

Na admissão no estudo, imediatamente antes da administração do ASMQ, o sangue será coletado para o seguinte:

- Repetir a contagem de parasitas (gota espessa e fina). Se for constatado posteriormente que essa parasitemia não atende mais ao critério de inclusão para parasitemia, os participantes serão mantidos no estudo
- coletar sangue seco (400 microlitros 4 manchas) em papel de filtro para:
 - Genotipagem de DNA parasita para desenvolvimento de vigilância genética;
 - Código de barras do parasita PCR (usando 24-200 SNPs) para comparar genótipos em caso de recorrência da infecção;
- Hemograma completo ou diferencial de leucócitos (tubo anticoagulado com EDTA)
- Medições de DNA e RNA de parasitas
- Cultivo de parasitas *in vitro* para sensibilidade a medicamentos (5 ml em adulto em tubo heparinizado)
- Avaliações bioquímicas basais, incluindo níveis de bilirrubina, ALT, AST, fosfatase alcalina e creatinina (tubo de soro de 5 ml)

Durante 3 dias de hospitalização, o sangue será coletado para:

Avaliações bioquímicas, incluindo níveis de bilirrubina, ALT, AST, fosfatase alcalina e creatinina (sangue heparinizado)

Hemograma completo ou diferencial de leucócitos e Hct e hb, se possível (tubo anticoagulado com EDTA)

4.1.11 Exame microscópico de sangue

4.1.11.1 Durante a internação

Gota espessa e fina para contagem de parasitas devem ser obtidas e examinados na triagem para confirmar a aderência aos critérios de inclusão e exclusão. Para todos os pacientes, a lâmina será realizada às 4h, 6h, 8h e 12h e, a cada 6 horas, até que a densidade do parasita assexuado seja indetectável (quando duas lâminas consecutivas de malária forem negativas. Em todos os casos, os papéis filtro de malária serão realizados às 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h (mesmo que dois exames de sangue negativos consecutivos tenham sido vistos antes desses períodos). Os pacientes podem receber alta se a liberação do parasita for alcançada, mas não antes das 72h. Os hematócritos serão feitos sempre que é feito um filme de sangue da malária. Nesses casos, que a eliminação do parasita não é alcançada dentro de 72h, a hospitalização deve ser prolongada e os filmes da malária devem ser verificados até a confirmação da liberação.

4.1.11.2 Durante consultas ambulatoriais

Gota espessa e fina será realizada nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 e em qualquer outro dia se o paciente retornar espontaneamente. A parasitemia será determinada a partir do número de hemácias parasitadas por 10.000 hemácias (película fina) ou do número de parasitas por 400 hemácias (película espessa). Para cada paciente, todos os esfregaços de sangue na triagem (100%), todos negativos (100%), aproximadamente 10% dos esfregaços positivos (selecionados aleatoriamente) e aproximadamente 70% dos esfregaços com um parasita por 400 leucócitos

serão lidos duas vezes por dois microscopistas qualificados independentes. Os resultados de esfregaços de sangue com discordantes microscopias (diferenças no diagnóstico das espécies, discrepâncias na densidade do parasita > 50% ou discordância na presença / ausência do parasita) serão reexaminados por um terceiro microscopista independente e as densidades dos parasitas serão calculadas pela média as duas contagens mais próximas.

Os pacientes serão monitorados por 42 dias. O acompanhamento consiste em visitas agendadas nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 e exames clínicos e laboratoriais correspondentes.

As amostras serão rotuladas anonimamente. O número da triagem ou o número do participante no estudo, a data e o dia do acompanhamento serão registrados na borda fosca do lado ou no vidro com uma caneta de vidro permanente.

Uma diluição fresca da corante Giemsa será preparada pelo menos uma vez ao dia e possivelmente com mais frequência, dependendo do número de lâminas a serem processadas. Filmes de sangue espessos e finos corados com Giemsa serão examinados com uma ampliação de 1000x para identificar as espécies de parasitas e determinar a densidade do parasita.

Na triagem, serão obtidas três lâminas de sangue por paciente: duas amostras de gota espessa e uma amostra de sangue fino para confirmação da espécie, se necessário. Um esfregaço de sangue espesso com o número de triagem será corado rapidamente (10% Giemsa por 10 a 15 minutos) para a triagem inicial, enquanto os outros serão retidos. Se o paciente for posteriormente matriculado, a segunda lâmina será corada com mais cuidado (i.e., 2,5-3% Giemsa por 45-60 min), e manchas mais lentas também serão usadas para todas as lâminas obtidas em outras consultas de acompanhamento.

O esfregaço de sangue espesso para a triagem inicial será usado para contar o número de parasitas assexuais e glóbulos brancos em um número limitado de campos microscópicos. A parasitemia adequada para o recrutamento é de 500 a 100.000 por microlitro.

O segundo esfregaço de sangue com o número do estudo será usado para calcular a densidade do parasita, contando o número de parasitas assexuais em um número definido de glóbulos brancos (normalmente 200) com um contador de contagem de mãos. Uma vez iniciado, o arquivamento deve ser contado até a conclusão; portanto, o número final de glóbulos brancos raramente será exatamente 200. Se mais de 500 parasitas foram contados antes que 200 glóbulos brancos forem atingidos, a contagem será interrompida após a conclusão da leitura do último arquivo. A densidade de parasitas, expressa como o número de parasitas assexuais por microlitro de sangue, será calculada dividindo o número de parasitas assexuais pelo número de glóbulos brancos e depois multiplicando por uma densidade de glóbulos brancos assumida (tipicamente 6000 por μ l).

Densidade parasitária (por μ l) = número de parasitas contados x (6000)

Número de leucócitos contados

A mesma técnica será usada para estabelecer a contagem de parasitas em cada filme de sangue subsequente. Quando o número de parasitas assexuais é inferior a 100 por 200 glóbulos brancos

em exames de acompanhamento, a contagem será feita em pelo menos 500 glóbulos brancos (ou seja, até a conclusão do campo em que 500 glóbulos brancos são contados).

Uma lâmina de sangue será considerada negativa quando o exame de 1000 glóbulos brancos ou 100 campos contendo pelo menos 10 glóbulos brancos por campo não revelar parasitas assexuais. A presença de gametócitos no rasteio ou slide de acompanhamento será registrada, mas essas informações não contribuirão para a avaliação básica.

Além disso, 100 campos do segundo filme espesso no dia 0 serão examinados para excluir infecções mistas; em caso de dúvida, o filme fino será examinado para confirmação. Se o exame do filme fino não for conclusivo, o paciente será excluído da análise após tratamento e acompanhamento completos.

Para detectar a presença de gametócitos, pelo menos 1000 glóbulos brancos devem ser contados.

4.1.12 Teste de gravidez

Pacientes do sexo feminino em idade fértil (ou seja, 18 a 45 anos) serão solicitadas a fazer um teste de gravidez na urina antes do recrutamento no estudo. Eles serão convidados a fazer um teste de gravidez na urina no dia 42. As participantes do sexo feminino em idade fértil devem evitar a gravidez durante o estudo. Contraceptivos orais, contraceptivos parenterais ou preservativos serão recomendados pelo pesquisador ou equipe de estudo no momento em que o consentimento informado for obtido, com aconselhamento apropriado sobre os riscos de engravidar e expor o feto aos medicamentos do estudo.

4.1.13 Genotipagem de parasitas da malária

Para diferenciar uma recrudescência (mesma cepa do parasita) de uma infecção recém-adquirida (cepa do parasita diferente), será realizada uma análise do genótipo. Isso se baseia na extensa diversidade genética entre os genes do parasita da malária *msp1*, *msp2* e *glurp*. Os perfis genotípicos de linhagens pré e pós-parasitas são comparados.

A fim de minimizar o desconforto do paciente devido a picadas nos dedos repetidas, duas a três gotas de sangue serão coletadas em papel de filtro durante a triagem e cada vez que esfregaços de sangue são necessários de acordo com o protocolo.

As amostras serão rotuladas anonimamente (número do estudo do paciente, data e dia do acompanhamento), mantidas em sacos plásticos individuais com bolsas dessecantes e protegidas da luz, umidade e temperatura extrema até serem analisadas. Quando essas condições não podem ser alcançadas, por exemplo, em ambientes extremamente úmidos, onde as condições do ar não estão disponíveis, pode-se considerar o armazenamento em uma geladeira ou freezer, mas deve-se tomar muito cuidado para proteger as amostras do gelo e da umidade. A técnica de PCR também será realizada, mas as amostras serão enviadas ao exterior para análise. Papéis de filtro emparelhados serão usados para extração e genotipagem de DNA de parasitas apenas em casos de falha do tratamento. Todos os papéis de filtro serão destruídos imediatamente após a conclusão das análises de PCR. O patrocinador fornecerá instruções ao

PI sobre procedimentos de transporte ou destruição de amostras biológicas coletadas durante o estudo.

4.1.14 Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *P. falciparum*

Um ensaio *in vitro* será realizado para medir as respostas dos parasitas aos derivados da artemisinina e aos medicamentos parceiros de acordo com os padrões mais recentes no momento da avaliação. Uma amostra de sangue (5 ml) para testes de drogas *in vitro* será coletada nas 0h para avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. falciparum* ao AS, MQ e a combinação ASMQ ou seus metabólitos. As amostras serão rotuladas anonimamente (número do estudo de pacientes, dia do acompanhamento, e data). Os parasitas também serão criopreservados para estudos futuros. Os resultados serão expressos em IC₅₀, IC₉₀, ou % de depuração retardada *in vitro*.

4.1.15 Marcadores moleculares para resistência a medicamentos antimaláricos

Duas a três gotas de sangue serão coletadas em papel de filtro no dia 0 e no dia da falha do tratamento para estudar o polimorfismo do *kelch13*, que são considerados marcadores de resistência aos derivados da artemisinina. As amostras serão rotuladas anonimamente (número do participante, dia de acompanhamento, data de coleta), mantidas em sacos plásticos individuais com bolsas dessecantes e protegidas da luz, umidade e temperatura extrema analisadas. Essas amostras (2 papéis de filtro com espaço circular para depósito de 50 µl de sangue total, uma lâmina de gota espessa e fina, e formulário de identificação da amostra) serão enviadas para o Wellcome Sanger Institute no Reino Unido, como forma de estabelecer a expressão genética do k13 e da carga parasitária do *P. falciparum* através da técnica de RT-PCR quantitativo.

4.1.16 Citocinas

Vários estudos sugerem que a resolução da infecção pelo *Plasmodium* depende da capacidade do hospedeiro de induzir níveis adequados de citocinas pró-inflamatórias precocemente [Dodoo D, Omer FM, Todd J, et al. J Infect Dis 2002]. A malária grave tem sido associada a altos níveis circulantes de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF) - α , interleucina (IL) -1 e IL-6. Estudos demonstraram uma ligação entre TNF- α , IL-6, IL-10 e a gravidade da doença na malária humana e altos níveis plasmáticos dessas citocinas são encontrados no diagnóstico, mesmo em casos de malária não complicados [Akanmori BD, Kurtzhals JÁ, Goka BQ et al. Eur Cytokine Netw 2000]. As citocinas anti-inflamatórias também têm papéis importantes na resposta imune contra o *Plasmodium*. A IL-10 tem um papel importante como imunorregulador durante a infecção por *P. falciparum*, neutralizando os efeitos de outras citocinas produzidas por células T-helper (Th) 1 e CD8 [Couper KN J Immunol 2008 & Dunst J Front Cell & Infect Micro 2017]. Assim, a resposta imune eficaz ao *P. falciparum* requer um equilíbrio de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e o desequilíbrio dessas respostas inflamatórias é responsável pela patologia observada na malária [Rodrigues-da-Silva RN et al. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014].

Alguns medicamentos como a cloroquina possui atividades antiplasmodiais e imunomodulatórias que inibe a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e aumenta a produção de IL-10 em ensaios in vitro [Ballal A Ann Hematol 2009, Karres I Am J Physiol 1998, Picot S, Peyron F, Donadille A et al. Immunology 1993]. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-12 e IFN- γ , demonstraram ser mediadores essenciais da imunidade protetora contra a fase eritocítica da infecção [Artavanis-Tsakonas K, Riley EM J Immunol 2002]. O artesunato é o medicamento mais eficaz no tratamento da malária grave. Além de sua atividade antiparasitária, uma propriedade antiinflamatória também foi relatada [Miranda AS, Brant F, Rocha NP, et al. Malar J 2013]. No modelo murino de malária cerebral, foi sugerido que o antimalárico artesunato além de apresentar uma atividade antiparasitária sistêmica foi capaz de regular as respostas inflamatórias no Sistema nervoso central diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias locais durante o curso da infecção [Miranda AS, Brant F, Rocha NP, et al. Malar J 2013]. Portanto, o nosso objetivo é avaliar os efeitos do tratamento com derivados de artemisinina no perfil de citocinas durante a infecção malárica. A nossa hipótese é que o tratamento pode alterar o padrão anti-inflamatórias e regulatórias das citocinas. Além disso, investigaremos se mutações genéticas associadas à resistência ao medicamento podem influenciar no perfil de citocinas e contribuir para uma falha no tratamento clínico.

4.1.17 Avaliação dos níveis séricos de citocinas

Dosagem simultânea de quatorze citocinas (IL - 1 β , IL - 2, IL - 4, IL - 5, IL - 6, IL - 7, IL - 10, IL - 12 p70, IL - 13, IL - 17, IFN - γ , TNF - α , G - CSF e GM - CSF) serão avaliadas no plasma dos indivíduos estudados utilizando o Kit comercial (14-plex humana cytokine panel, Bio-Rad, EUA) em combinação com o sistema Luminex. O ensaio será realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 50 μ L das microesferas revestidas com anticorpos monoclonais para a detecção das citocinas mencionadas acima serão adicionadas aos poços de uma placa de microtitulação de 96 poços pré-umedecida. Após 1 h de incubação e lavagem, 25 μ L da mistura de anticorpos de detecção serão adicionados e as amostras incubadas por 30 min sob leve agitação seguido de lavagem. Finalmente, 50 μ L de estreptavidina - PE serão adicionados e após 10 min de incubação e lavagem, as microesferas serão ressuspensas em 125 μ L de tampão de ensaio a cada poço, para análise no leitor de Luminex (Luminex 200™, Luminex®, Austin, TX, EUA). As concentrações de cada parâmetro analisado nas amostras de plasma serão estimadas a partir da curva padrão, utilizando o software Milliplex Analyst, (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Os níveis séricos das citocinas serão expressos como picogramas por mililitro (pg/mL).

4.1.18 Anticorpos específicos para proteínas dos plasmódios

A resposta humoral a antígenos plasmodiais tem sido utilizada para medir a intensidade de transmissão da malária e está sendo cada vez mais incorporada em estudos transversais e

longitudinais para monitorar mudanças na transmissão, identificar *hot spots* de transmissão e grupos de alto risco em áreas da África, Ásia e na região Amazônica [Cook J, Speybroeck N, Sochanta T et al. Malar J 2012; Cook J, Reid H, Lavro J, et al. Malar J 2010; Kusi KA, Bosomprah S, Dodo D et al. Malar J 2014]. Entretanto, a utilidade dos marcadores sorológicos para avaliar a endemicidade em condições de baixa transmissão e seu potencial de uso como evidência de infecção atual e recente ainda é controverso.

Recentemente, vários grupos de pesquisa desenvolveram recentemente ensaios sorológicos multiplex para a detecção simultânea de anticorpos contra uma variedade de antígenos Plasmodiais e em tem sido utilizado para a aquisição de informações epidemiológicas para serem implementadas em programas de controle da malária [Kerkhof K, Canier L, Kim S, et al. Malar J 2015; Rogier E, Wiegand R, Moss D, et al. Malar J; Helb DA, Tetteh KKA, Felgner PL et al. Proc Natl Acad Sci USA 2015]. Dada a ampla utilidade da sorologia por multiplex, o nosso objetivo é identificar marcadores sorológicos de exposição recente e de infecções assintomáticas incluindo presença de hipnozoítas e validarmos seu uso em regiões endêmicas de malária no Brasil.

4.1.19 Ensaio multiplex para pesquisa de anticorpos

Todos os antígenos serão acoplados as esferas magnéticas (Luminex Corp, Austin, TX, EUA) de acordo com estudos anteriores. Resumidamente, as esferas serão submetidas ao vortex, transferidas para um tubo de microcentrífuga e centrifugadas por 1,5 min a 13.000 g. O sobrenadante será removido e as esferas lavadas com uma solução de fosfato de sódio (NaP) 0,1 M e pH 6,2. As esferas serão ativadas por suspensão em NaP com 5 mg /mL de EDC (cloridrato de 1-etil-3- [3-dimetilaminotetrahidropiril] carbodiimida) e 5 mg/mL de sulfo-NHS (sulfo N-hidroxissulfosuccinimida) e incubadas sob rotação por 20 min à temperatura ambiente (TA). Após uma lavagem com tampão de acoplamento (ácido 2- (4-morfolino) -etanossulfônico 50 mM, NaCl 0,85% em pH 5,0), os antígenos serão acoplados as esferas na presença de tampão de acoplamento por 2 h a uma concentração de 20 ug /mL para todos os antígenos. As esferas serão lavadas uma vez com PBS e suspensas em PBS com 1% de albumina de soro bovino (BSA) com incubação por 30 min à temperatura ambiente sob rotação. As esferas serão então ressuspensas em um tampão de armazenamento (PBS, 1% BSA, 0,02% de azida de sódio e 0,05% Tween-20) e armazenadas a 4 ° C. As esferas acopladas serão utilizadas com um painel de soros negativos conhecidos para garantir que o sinal mínimo, não específico será dado pelas esferas usados neste estudo.

4.1.20 Imunoensaio

O imunoensaio será conduzido conforme descrito anteriormente. Em resumo, uma alíquota de 500 µl da mistura de microesferas será diluída para uma concentração de 1000 esferas/Ag/poço. A partir dessa mistura de microesferas, 25 µl serão adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços, seguido por 50 µl de amostra de soro diluída (1: 200) [26]. Como um controle para o imunoensaio, um pool de soros negativos (não expostos) será adicionado a cada placa em duplicata a uma diluição de 1: 100 em PBS-Cr. Um pool de soros positivos contendo soros de quatro indivíduos com teste positivo para *P. falciparum* e *P. vivax* será adicionado a cada placa em duplicata nas diluições 1: 100, 1: 400 e 1: 1600. Para as etapas de lavagem será usado PBS-

TBN e 100 µl/poço de anticorpo anti-IgG humana produzida em cabra conjugada a ficoeritrina será adicionado [26]. Em uma etapa final, as esferas serão resuspensas em 100 µl de PBS-BSA a 5%, pH 7,4 e serão analisadas e lidas pelo sistema MAGPIX®. Os resultados serão representados pela mediana da intensidade fluorescência (MFI).

4.1.21 Avaliação de segurança

Um questionário de sintomas será realizado diariamente durante a hospitalização em cada visita subsequente ao centro de saúde, para auxiliar na identificação de eventos adversos. O investigador é responsável pela detecção e documentação de eventos que atendem aos critérios e definição de um evento adverso (EA) ou evento adverso grave (EAG), conforme previsto neste protocolo.

Todos os EAG e EAs serão prontamente documentados desde o momento da inclusão no estudo até a descontinuação do paciente da participação no estudo. Quaisquer eventos que ocorram entre a triagem e a administração do medicamento antes do estudo serão considerados condições basais e pré-existentes.

Todos os EAs devem ser registrados na ficha clínica EA / EA. Para evitar expressões coloquiais, o evento adverso deve ser relatado na terminologia médica padrão. Sempre que possível, o evento adverso deve ser avaliado e relatado como diagnóstico e não como sinais ou sintomas individuais. Se um diagnóstico definitivo não for possível, os sintomas e sinais individuais devem ser registrados. Sempre que possível, a etiologia dos achados anormais será documentada na ficha de registro de casos. Quaisquer resultados laboratoriais relevantes adicionais obtidos pelo investigador durante o curso deste estudo serão registrados na ficha clínica.

Se o evento atender aos critérios de “grave”, o EAG deverá ser relatada ao investigador principal dentro de 24 horas a partir da data em que o evento foi identificado. Se mais dados forem necessários, documentação adicional pode ser enviada. Todos os EAGs devem ser seguidos até a resolução ou até que o EAG seja considerado permanente ou leve à morte.

4.1.21.1 Definições:

Evento Adverso (EA): Um EA é qualquer evento indesejável ou deterioração clínica que ocorra a um participante do estudo durante o curso do estudo; isso é; desde o momento da administração dos medicamentos do estudo até o término do estudo (isto é, até a visita de acompanhamento), se esse evento é considerado relacionado ou não aos medicamentos do estudo ou a um medicamento ou procedimento concomitante; por exemplo.

- Qualquer sintoma desfavorável e não intencional
- sinal físico
- resultado laboratorial anormal
- Uma doença

Qualquer novo sinal clínico ou deterioração clínica que ocorra entre a assinatura do formulário de consentimento e a administração dos medicamentos do estudo não é um EA. Esta informação será registrada nos registros médicos, como uma condição pré-existente.

Evento Adverso Sério (EAG): Um evento adverso grave é um EA que:

- a) óbito;

- b) ameaça à vida;
- c) incapacidade/invalidade persistente ou significativa;
- d) exige internação hospitalar ou prolonga internação;
- e) anomalia congênita ou defeito de nascimento;
- f) qualquer suspeita de transmissão de agente infeccioso por meio de um medicamento ou;
- g) evento clinicamente significante.

4.1.21.2 Avaliação de causalidade

O investigador é obrigado a avaliar a relação de causalidade entre o medicamento em estudo e a ocorrência de cada EA / EAG usando as seguintes categorias de relação:

- Definido: associação temporal clara
- Provável: associação temporal clara, com melhora na retirada do medicamento, e não é razoavelmente explicada pelo estado clínico conhecido ou outra etiologia do paciente
- Possível: associação temporal menos clara; outras etiologias são possíveis (outras etiologias possíveis devem ser registradas no CRF)
- Não relacionado: nenhuma associação temporal com o medicamento do estudo; avaliado como relacionado a outras etiologias, como medicações ou condições concomitantes, ou pacientes; estado clínico conhecido

O investigador fornecerá a avaliação da causalidade de acordo com a ferramenta de coleta de dados AE / SAE.

4.1.21.3 Desfecho

O investigador acompanhará o EA/EAG até a resolução ou até que nenhuma informação clinicamente relevante possa ser esperada e é o responsável pela comunicação com os órgãos ético regulatórios aplicáveis. Os resultados de EA e EAG serão classificados da seguinte forma:

- Continua
- Resolvido
- Resolvido com sequelas
- Permanente
- Fatal

4.1.22 Pacientes com parasitemia recorrente

Os pacientes com parasitemia falciparum recorrente (incluindo misturados com outras espécies da malária) durante o acompanhamento receberão sangue para o seguinte:

Repita a contagem de parasitas (filmes espessos e finos)

Coleta de sangue total no papel de filtro (400 microlitros, 4 manchas coletadas em cartões Whatman FTA) para:

- Genotipagem de DNA parasita para o desenvolvimento da vigilância genética
- Código de barras do parasita PCR (usando 24-200 SNPs) para comparar genótipos em caso de recorrência da infecção

Hemograma completo ou diferencial de leucócitos e Hct e Hb, se possível (anticoagulado por EDTA)

Medições de qPCR

Cultivo de parasitas *in vitro* para sensibilidade e ensaios a medicamentos (5 ml de sangue adulto, heparinizado)

Em caso de infecção recorrente, os indivíduos ainda devem ser acompanhados de acordo com o protocolo do estudo até o dia 42.

Pacientes que desenvolverem parasitemia não falciparum durante o acompanhamento serão tratados de acordo com as diretrizes locais.

4.2 Definição de perda no acompanhamento

A perda no acompanhamento ocorre quando, apesar de todos os esforços razoáveis, um participante incluído não comparece às visitas agendadas e não pode ser encontrado. Nenhum resultado do tratamento será atribuído a esses participantes. Todo esforço deve ser feito para agendar uma visita de acompanhamento para participantes que não retornam ao local do estudo, principalmente após a administração do medicamento. Esses participantes serão classificados como perdidos para acompanhamento e censurados ou excluídos da análise. Participantes que perderam o acompanhamento, mas que subsequentemente retornam ao local do estudo antes do Dia 42, não serão afastados e serão incentivados a retornar para as consultas de check-up. O investigador principal decidirá se o participante deve ser definitivamente retirado do estudo e classificado como perdido para acompanhamento com base em sua história e comportamento, ou deve ser mantido no estudo para a avaliação final.

4.3 Descontinuação do participante ou violação do protocolo

Os participantes do estudo que atenderem a um dos seguintes critérios serão classificados como retirados:

- Retirada do consentimento por escrito ou verbalmente: um participante pode retirar o consentimento a qualquer momento, sem prejuízo de posterior acompanhamento ou tratamento no local do estudo. No entanto, os dados acumulados até o momento da descontinuação serão utilizados na análise.
- Falha na conclusão do tratamento devido a:
 - Vômito persistente durante o tratamento. Um paciente que vomitar o medicamento do estudo duas vezes será retirado do estudo e receberá tratamento de resgate
 - Eventos adversos graves que requerem a interrupção do tratamento antes da conclusão do curso completo. Um paciente pode ser descontinuado do estudo se o investigador principal ou a pessoa por ele delegada, assim o decidir devido a um evento adverso. Nesse caso, as informações sobre o evento adverso e o tratamento sintomático administrado devem ser registradas em um formulário de relatório de caso. Se o evento adverso for grave, o investigador principal deve notificar imediatamente (o mais tardar em 72 horas) e seguir os procedimentos de notificação descritos em outras partes deste protocolo.

- Violação de inclusão:
 - Malária grave desenvolvida dentro de 24 horas após o início do tratamento
 - Inclusão incorreta de um paciente que não atende aos critérios de inclusão
- Violação voluntária de protocolo: administração de antimalárico por terceiros ou por terceiros (ou antibióticos com atividade antimalárica); veja o apêndice para uma lista abrangente
- Violação involuntária do protocolo:
 - Ocorrência durante o acompanhamento de doença concomitante que interferiria com uma classificação clara do resultado do tratamento;
 - Detecção de monoinfecção por outra espécie da malária durante o acompanhamento;
 - Classificação de um paciente devido a um erro de laboratório (parasitemia), levando à administração de tratamento de resgate

Os pacientes que forem retirados serão acompanhados até a recuperação ou o final do acompanhamento, se possível. No entanto, nenhum resultado do tratamento será atribuído a esses pacientes e eles serão censurados ou excluídos da análise. Os motivos da descontinuação ou violação do protocolo serão registrados na ficha clínica.

A gravidez detectada durante o acompanhamento não constitui um motivo para a retirada, mas o evento deve ser registrado e gerenciado conforme descrito mais adiante neste protocolo. O investigador principal deve fazer todos os esforços razoáveis para descobrir o resultado da gravidez e preencher o formulário de gravidez. Se houver uma anormalidade congênita ou um bebê ainda nascido, isso deve ser relatado como um evento adverso grave.

4.4 Desfecho secundário principal:

Quantificar a cinética de clareamento do parasita *in vivo* usando um estimador padronizado de depuração do parasita entre pacientes adultos com malária falciparum não complicada, tratados com ASMQ FDC.

O objetivo primário é a meia-vida parasitária (doravante denominada "meia-vida") definida pela inclinação das curvas de eliminação do parasita transformadas em $\log_e$. O tempo de eliminação do parasita (PCT) é definido como o tempo do primeiro de dois exames de sangue negativos consecutivos. As razões de redução de parasitas (PRRs) são calculadas como 100 menos a redução percentual da linha de base. PC50, PC90 e PC99 são os tempos necessários para reduzir a parasitemia com 50%, 90% e 99%, respectivamente, do valor da linha de base.

A meia-vida da depuração do parasita - ou seja, o tempo para a densidade do parasita diminuir em 50% - será calculada com o estimador de liberação do parasita desenvolvido pela Rede Mundial de Resistência Antimalárica (WWARN). Este instrumento calcula a taxa de eliminação do parasita constante para cada paciente, com base na parte linear do perfil de densidade-tempo do $\log_e$ parasita [Flegg JA, Guerin PJ, White NJ et al. Mar J. 2011].

4.5 Tratamentos

4.5.1 Tratamento antimalárico

A combinação de dose fixa Artesunato + Mefloquina (ASMQ, Fiocruz, Farmanguinhos, Ministério da Saúde) será fornecida por Farmanguinhos como comprimidos de alta dose contendo 100 mg de AS e 220 mg de cloridrato de MQ (200 mg de base de MQ) e comprimidos de baixa dose com 25 mg de AS e 55 mg de cloridrato de MQ (50 mg de MQ base), de acordo com o peso dos participantes. Para informações detalhadas sobre dosagem, consulte o Apêndice. A Diretriz Nacional da Malária recomenda a administração de ASMQ com alimentos para aumentar a biodisponibilidade do medicamento.

Todos os esforços serão feitos para armazenar a medicação ASMQ FDC de acordo com as recomendações do fabricante em uma área segura. Isso pode ser difícil em alguns locais onde não há salas de armazenamento com ar-condicionado. Onde o armazenamento monitorado não for possível e as condições não atenderem às recomendações, os derivados da artemisinina e o conteúdo do medicamento parceiro (i.e., MQ) dos lotes de ASMQ serão testados novamente no final do estudo.

O prazo de validade dos comprimidos ASMQ FDC é de três anos à partir da data de fabricação, conforme aprovado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O ASMQ FDC é um blister embalado em alumínio para garantir a máxima estabilidade e integridade do produto em climas tropicais. Instalações apropriadas de transporte e armazenamento contribuem para manter a estabilidade do produto em condições tropicais nos países endêmicos da malária.

Antes do início do estudo, uma avaliação de garantia de qualidade independente do ASMQ será verificada no hospital de referência nacional, a partir do lote de medicamentos que estarão disponíveis para o estudo. Três comprimidos selecionados aleatoriamente do lote serão analisados quanto a ingredientes ativos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme descrito na 4ª edição da International Pharmacopeia. Resumidamente, o material do comprimido pulverizado será pesado, dissolvido em metanol acidificado e sonificado por 20 minutos. Uma porção filtrada será injetada em um sistema de HPLC e os componentes separados usando uma coluna de fase reversa e uma fase móvel de 65% de acetroniril e 35% de tampão de perclorato de sódio a 0,05 M a 35%. A detecção será realizada usando absorvância ultravioleta.

Todas as doses de comprimidos ASMQ FDC serão administradas sob supervisão direta (ou seja, tratamento diretamente observado) por um membro qualificado da equipe de estudo, designado pelo investigador principal, e exigirão hospitalização durante o tratamento - 3 dias. Se o paciente vomitar e a dose for readministrada, deve ser descrito no documento fonte.

Todas as movimentações do medicamento do estudo serão registrados. Tanto o medicamento em estudo do paciente individual quanto os registros gerais de responsabilização por medicamentos serão mantidos atualizados pela equipe do estudo.

4.5.2 Tratamento e medicação concomitante que não devem ser usados para os participantes recrutados para o Braço I

Ao longo do estudo, os médicos podem prescrever medicamentos ou tratamentos concomitantes considerados necessários (ou seja, antipiréticos ou anti-eméticos) para fornecer cuidados de suporte adequados, exceto antibióticos com atividade antimalárica, a menos que sejam inevitáveis (ou seja, doxiciclina, azitromicina). Se isso for necessário, os pacientes serão mantidos no estudo e isso será anotado como um desvio de protocolo. Anti-eméticos não devem ser prescritos como profilaxia se não houver náusea ou vômito.

Febre acima de 38 ° C pode ser tratada com paracetamol ou dipirona. Os eventos adversos que requerem tratamento devem ser tratados de acordo com as melhores práticas locais disponíveis. Se houver indicação clínica para qualquer medicamento adicional, o curso do estudo, incluindo o medicamento administrado para tratar um evento adverso relacionado ao medicamento do estudo, a dosagem e a data e hora da administração devem ser registradas no formulário de relato de caso.

O uso de medicamentos fitoterápicos durante o estudo deve ser evitado, e os participantes devem ser incentivados a retornar ao local do estudo para tratamento, caso se sintam mal. Se algum medicamento fitoterápico for tomado durante o estudo, ele deve ser registrado no documento fonte, sob administração de medicamentos do estudo.

4.5.3 Tratamento de resgate

Se um paciente vomitar duas vezes, ele ou ela receberá terapia parenteral com artesunato e será retirado do estudo.

Qualquer paciente com sinais de malária grave ou complicada será hospitalizado e receberá artesunato parenteral e tratamento de suporte relevante de acordo com as diretrizes brasileiras de tratamento da malária.

Se um paciente atender a um dos critérios terapêuticos, ele receberá AL de acordo com as recomendações nacionais atuais. Se o paciente for reinfectado com outra espécie de malária, ele receberá ASMQ e 7 dias de primaquina, de acordo com as recomendações atuais do tratamento da malária.

Artesunato IV / IM: 2,4 mg / kg de peso corporal (pc) IV ou IM na admissão (primeira hora), seguido de 2,4 mg / kg de peso corporal às 12 horas (primeiro dia). Depois disso, a admissão de 2,4 mg / kg de peso corporal IV / IM uma vez ao dia até que o paciente possa tolerar a terapia oral, então o tratamento deve ser trocado para comprimidos de AL FDC por três dias. O tratamento com artesunato IV / IM é recomendado pelo menos 24 horas, mesmo quando o paciente pode tolerar terapia oral. (IV / IM, 2,4 mg / kg de peso corporal na primeira hora, seguidos de 2,4 mg / kg às 12 horas.

4.6 Critérios de avaliação

Os objetivos deste braço incluem a taxa de clareamento do parasita e as estimativas de eficácia após o tratamento com ASMQ. As estimativas de eficácia são falha no tratamento, conclusão do período de acompanhamento sem falha no tratamento (ACPR), perda no acompanhamento,

retirada do estudo, incluindo violação do protocolo. Em todo o momento, o bem-estar do paciente terá prioridade sobre sua continuação no estudo.

4.6.1 Avaliação de eficácia e segurança

4.6.1.1 Classificação dos resultados do tratamento

Os resultados do tratamento serão classificados com base em uma avaliação dos resultados parasitológicos e clínicos do ASMQ, de acordo com as mais recentes diretrizes da OMS. Assim, todos os pacientes serão classificados como tendo falência precoce do tratamento, falência clínica tardia, falência parasitológica tardia ou resposta clínica e parasitológica adequada, conforme definido no Apêndice.

Como a cura parasitológica é o objetivo da terapia antimalárica, todos os pacientes do estudo que demonstrarem falha no tratamento receberão tratamento de resgate. O acompanhamento continuará até a recuperação. O resultado do tratamento de resgate nesses pacientes não precisa ser registrado sistematicamente para os fins do estudo de vigilância.

4.6.2 Desfechos de segurança

A incidência de qualquer evento adverso será documentada. Todos os participantes serão questionados rotineiramente sobre os sintomas anteriores e sobre os sintomas que surgiram desde a visita de acompanhamento anterior. Quando clinicamente indicado, os pacientes serão avaliados e tratados adequadamente. Todos os eventos adversos, relacionados ou não a medicamentos, serão registrados no formulário de relato de caso. Eventos adversos graves (veja as definições abaixo) devem ser relatados ao patrocinador e ao CEP.

5. Procedimentos Braço II

Procedimentos	Amostra (mL)	SCR	Visita do Estudo
Consentimento informado	NA	X	
Dados demográficos / história médica	NA	X	
Sinais vitais	NA	X	

Peso	NA	X	
Exame físico	NA	X	
Questionário de sintomas	WB (0.1)		
Esfregaço de sangue	EDTA (4)		X
CBC (<i>complete blood count</i>)	Finger prick (0.2)		X
DBS (<i>dried blood spot</i>)	Serum (5)		X
Bioquímica			X
RDT HRP2			X
RDT LDH			(X)
Total (mL)			9.2

RDT: teste rápido diagnóstico / HRP2 Plasmodium falciparum histidine rich protein / LDH: lactate dehydrogenase / WB: sangue total / NA: não aplicável

5.1. Triagem, procedimentos, acompanhamento e análises laboratoriais

Os participantes que procurarem atendimento nos centros de estudo com suspeita de malária falciparum serão triados e avaliados quanto aos possíveis critérios de elegibilidade. A triagem seguirá as normas da rotina do centro realizada pelo profissional de saúde alocado na unidade, com base as nas diretrizes do programa nacional de controle de malária. O que será enfatizado é o rasteio com base em métodos alternativos a HRP2, que incluem TR com base na LDH ou a microscopia realizada por microscopistas devidamente treinados. O TR HRP2 será o mesmo que estiver sendo recomendado pelo Ministério da Saúde e usado nas redes de saúde públicas. O TR baseado em LDH deve reunir os critérios de certificação da OMS (score de detecção de Plasmodium > 90 ul quando a parasitemia for de 2000/ul e percentual de falsos positivos e inválidos < 2%). A microscopia é um dos métodos confirmatórios não baseado em HRP2, e será realizada com base em POP aprovados pelo Ministério da Saúde.

Após o consentimento do participante, os investigadores completarão um formulário de registro de caso contendo variáveis sócio-epidemiológicas incluindo idade, gênero, história recente de testagem positiva por malária, e moradia. Os formulários de registro de caso, o TR HRP2, o TR LDH e a lâmina serão etiquetadas conforme o número único de identificação do participante atribuído de forma sequencial. Os TR e as lâminas serão armazenadas em local seguro para posterior controle da qualidade. Tubo com EDTA e outro de soro (baseada no peso corporal, recomendado segundo as diretrizes da OMS) serão coletados para posterior centrifugação e separação em plasma e soro. Nos casos em que for difícil a coleta de sangue, coletaremos dois cartões de papel de filtro (DBS) contendo 50ul por spot. Esses cartões deverão ser deixados secar por 24 horas, e colocados em um plástico impermeável contendo dessecante. O saco contendo os papéis de filtro deverão ser devidamente identificados com o número único do participante. Os formulários de registro clínico, os TRs e os sacos contendo os papéis de filtro deverão ser enviados para o laboratório central no centro coordenador.

Amostras de participantes com suspeita TR HRP2 falso negativo serão encaminhados prioritariamente para a realização de avaliação molecular e sorológica das deleções de interesse, em laboratórios qualificados participantes.

Todos os participantes recrutados serão convidados a serem acompanhados através de visitas telefônicas em datas programadas para avaliação do desfecho de tratamento de acordo com a presença ou não das mutações *p_fhrp2/3*.

5.1.1. Análises laboratoriais

5.1.1.1. Testes de diagnóstico rápido (TR)

TRs serão realizados de acordo com as instruções do fabricante.

5.1.1.2. Caracterização molecular

A caracterização molecular será conduzida em um laboratório com experiência em técnicas moleculares +/- sorológicas para malária e que subscreve o esquema de avaliação externa da qualidade (EQA) da OMS para teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) ou outro esquema para métodos moleculares de malária. A PCR quantitativa é preferida em relação aos métodos de amplificação de ácido nucleico não quantitativos, especialmente se a densidade do parasita não for medida por microscopia.

Os métodos propostos abaixo são baseados em Cheng et al. mas pode mudar dependendo do laboratório de referência.

5.1.1.3. Extração de DNA e controle de qualidade

Para verificação da qualidade do DNA, uma alíquota do DNA deve ser utilizada para amplificação dos genes *m_{sp}1*, *m_{sp}2* e *glurp*, de acordo com protocolos padrões publicados.

5.1.1.4. Diagnóstico de espécies moleculares

Pares de *primers* específicos devem ser usados para quatro ou cinco reações de amplificação separadas e específicas de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*.

5.1.1.5. Caracterização de sequências de *p_fhrp2* e *p_fhrp3* e deleções de genes em amostras

As sequências de *primer* sugeridas, as condições de PCR e os tamanhos esperados do produto de amplificação foram publicados previamente [Cheng Q et al. Mal J 2014]. Os genes *p_fhrp2* e *p_fhrp3* devem ser caracterizados pela amplificação de dois segmentos gênicos. Um segmento se estende do final do exon 1 ao início do exon 2, incluindo o íntron de cada gene. O outro segmento consiste em todo o exon 2, que codifica a região de repetição rica em histidina-alanina de cada proteína. Os ensaios de PCR devem incluir controles apropriados, incluindo DNA de cepas de laboratório com deleções conhecidas, como DD2 (*p_fhrp2*-excluído) e HB3 (*p_fhrp3*-excluído). Se o gene *p_fhrp2* puder ser amplificado, a sequência do amplicon do exon 2 será

determinada e traduzida em uma sequência de aminoácidos. Isso permitirá a classificação da proteína p_fHRP2 como tipo A, tipo B ou tipo C / grupo estrutural limítrofe, de acordo com o número multiplicado de repetições de tipo 2 e tipo 7 (ver acima). Se os genes p_fhrp2 e / ou p_fhrp3 não podem ser amplificados apesar da boa qualidade do DNA demonstrada pela amplificação de outras sequências de genes de cópia única, isso sugere que os genes foram deletados. Opcionalmente, a fim de confirmar e caracterizar as deleções subteloméricas, os seguintes genes flanqueadores a montante e a jusante de p_fhrp2 e / ou p_fhrp3 podem ser amplificados: o gene HPC230 localizado ~ 5,5 kb a montante e HSP70 localizado ~ 6,5 kb a jusante de p_fhrp2; e o gene HPC475 localizado ~ 1,7 kb a montante e ACL localizado ~ 4,4 kb a jusante de p_fhrp3.

5.1.1.6. Sorologia HRP2 & pLDH

A partir de amostras plasma ou dos cartões de filtro, a detecção ultrasensível de HRP2 e pLDH por imunoensaio de esferas multiplex ou ELISA pode ser usada para apoiar os resultados de genotipagem e, particularmente, para resolver a discordância entre os resultados de RDT e PCR.

6. Cooperação estrangeira

Amostras biológicas serão enviadas para o Wellcome Sanger Institute em Hinxton, Reino Unido, com o objetivo de investigar marcadores moleculares de resistência a artemisinina (i.e.; k13) e ou as drogas companheiras como a mefloquina, e a quantificação da carga do plasmodium. Esta iniciativa faz parte de uma colaboração mundial denominada de SpotMalaria (<https://www.malariagen.net/projects/spotmalaria>) que tem como objetivo criar um melhor entendimento da epidemiologia molecular dos parasitas como forma de dar melhor resposta nas medidas de controle da doença em diferentes partes do globo onde a malária é endêmica.

7. Armazenamento de amostras biológicas

O projeto contempla armazenamento de amostras biológicas para que amostras bem caracterizadas clinicamente possam ser utilizadas posteriormente no desenvolvimento de ferramentas que auxiliem na identificação precoce de parasitas com resistência aos derivados da artemisinina.

Será realizado armazenamento destas amostras pelo prazo de 5 anos em repositório local mantido pelo grupo de pesquisa envolvido (Laboratório de Pesquisa clínica em doença febril aguda do INI/FIOCRUZ). Para fins de armazenamento, nenhuma informação pessoal será ligada a qualquer das amostras armazenadas. No caso de proposta que envolva outro objetivo não claramente definido, será submetida solicitação ao CEP/CONEP e a utilização das amostras apenas ocorrerá se novo consentimento for obtido do participante. O participante terá a todo e qualquer momento a possibilidade de decidir se quer manter as amostras armazenadas para estudos futuros, e caso for seu desejo retirar o consentimento, as amostras serão destruídas. Todas estas possibilidades estarão claramente descritas no TCLE/TALE. Armazenaremos alíquotas de soro, plasma, papa de hemácias e papel de filtro.

8. Propriedade Intelectual

O presente projeto não prevê pedido de patente nem registro de propriedade intelectual.

9. GESTÃO DE DADOS

9.1 Documentos Fonte

Documentos fonte são documentos, dados e registros originais dos quais informações dos participantes são obtidas. Isso inclui, entre outros, registros hospitalares (a partir dos quais histórico médico e medicamentos anteriores e simultâneos podem ser resumidos na transcrição para a ficha clínica), prontuários clínicos e de consultório, registros de laboratórios e farmácias, diários, microfichas, radiografias e fichas clínicas.

As entradas das fichas clínicas serão consideradas documento fonte se ficha clínica for o local do preenchimento inicial (isto é, não houver outro registro escrito ou eletrônico de dados anterior). Neste estudo, as fichas clínicas serão usadas como documento fonte para a maioria dos dados de coleta de dados.

Todos os documentos serão armazenados com segurança em condições confidenciais. Em todos os documentos específicos do estudo, exceto o termo de consentimento livre e esclarecido preenchido e assinado, o participante será referido pelo número de inclusão e pelas suas iniciais, não pelo nome.

9.2 Braço I

O investigador principal garantirá que o protocolo do estudo seja estritamente respeitado e que todos os dados sejam coletados e registrados corretamente nos formulários de relatório de caso. Os dados clínicos e laboratoriais serão registrados diariamente no formulário de relatório de caso desenvolvido para o estudo. Os dados derivados dos documentos de origem devem ser consistentes com os documentos de origem ou as discrepâncias devem ser explicadas. Qualquer alteração ou correção em um formulário de relatório de caso deve ser datada e explicada e não deve obscurecer a entrada original. Todos os formulários de relatório de caso serão verificados quanto à integridade.

Após a conclusão do estudo, os dados serão inseridos em um banco de dados por dupla entrada independente, de acordo com os procedimentos padrão da OMS. Os dados do estudo serão armazenados em um banco de dados do computador, mantendo a confidencialidade.

O investigador principal é responsável por manter os formulários, os formulários de relatório de caso e o código de identificação do paciente preenchido em um local seguro (triagem do paciente e diário de registro).

O software REDCap (Research Electronic Data Capture, Vanderbilt University, USA) será usado para a coleta, gerenciamento de dados, e controle do fluxo de amostras.

9.3 Braço II

Após a dupla entrada de dados e reconciliação de quaisquer erros, a prevalência de resultados HRP2 TR falso-negativos (com base em diagnóstico) que são suspeitos de serem causados por deleções do gene *pfhrp2* /3 será determinada em o domínio / nível provincial, com ICs de 95% estimados para todas as estimativas pontuais. As estimativas dessa primeira prevalência serão então desagregadas por faixa etária, sexo, vila / residência e tratamento antimalárico recente para verificar se existem padrões. Se desejado, estimativas pontuais e ICs de 95% podem ser ponderados pelo tamanho relativo da instalação ou fluxos de pacientes. As diferenças entre as estimativas pontuais em variáveis sociodemográficas ou outras variáveis coletadas podem ser investigadas usando χ^2 e / ou regressões logísticas, conforme desejado.

Após a conclusão das análises laboratoriais, a prevalência de deleções do gene *pfhrp2* / 3 com base na genotipagem +/- sorologia com 95% ICs para todas as estimativas pontuais.

Além disso, a análise final incluirá:

- O número total de casos suspeitos de malária rastreados
- A taxa de positividade TR por unidade de saúde
- O desempenho comparativo de TR e linhas de teste RDT para a detecção de *P. falciparum*

O software REDCap (Research Electronic Data Capture, Vanderbilt University, USA) será usado para a coleta, gerenciamento de dados, e controle do fluxo de amostras.

10. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

10.1. Braço I

Este estudo não foi projetado principalmente para avaliar a eficácia do ASMQ per se, mas para determinar se há alguma evidência de eliminação prolongada do parasita após o ASMQ oral em pacientes com malária *falciparum* não complicada.

A meia-vida de liberação de parasitas ($PC_{1/2}$) será estimada usando o Estimador de liberação de parasitas da WWARN. Iremos avaliar a depuração do parasita usando um método de ajuste padronizado que separa a fase de atraso inicial variável, durante a qual o parasita conta nivelar ou subir, do subsequente declínio log-linear. O declive desta fase é calculado e expresso como a meia-vida de eliminação do parasita, que é o tempo necessário para que a parasitemia caia pela metade durante o declínio log-linear

10.1.1. Estimativa de cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base na precisão da proporção hipotética de pacientes que têm o atraso na eliminação de parasitas definido como meia-vida de declive

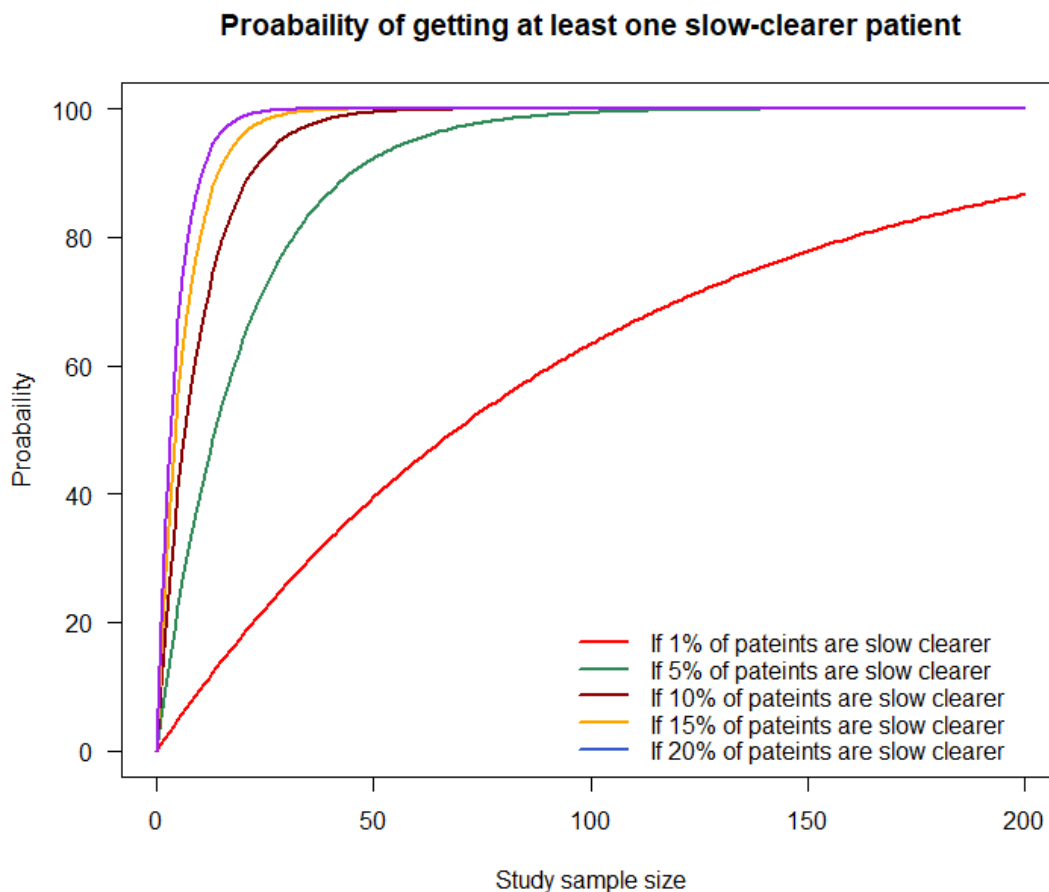
superior a 5,5 horas (o desfecho primário). Antecipou-se que em 5% da população de pacientes será observada uma lenta eliminação dos parasitas. Para estimar isso com 10% de precisão com base no intervalo de confiança bilateral de 95%, são necessários pelo menos 83 pacientes. Para proporções observadas com 2%, 10% e 15%, o tamanho da amostra será estimado para a proporção dada com 7,3%, 13,1% e 15,3% de precisão respectivamente. Alternativamente, se a proporção verdadeira de clareador lento for 10%, 12% e 15%, o tamanho da amostra estimado de 83 tem poder de 62%, 80% e 94%, respectivamente, para detetar a diferença usando um teste exato unilateral com um nível de significância (alfa) de 5%.

Assumindo que 10% dos pacientes não serão capazes de contribuir para a análise final (amostras perdidas ou danificadas), o fator de ajuste é 1,11, o que dá o número final de pacientes necessários para ser 93. Este tamanho de amostra permitirá detetar pelo menos um parasita resistente com probabilidade de 0,99 na proporção hipotetizada (Figura 1).

O fator de ajuste para amostras perdidas foi realizado usando a equação descrita em Kirkwood e Sterne (2003) [1]. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado usando Power Analysis and Sample Size Software (PASS) versão 16 [2].

[1] Kirkwood, Betty R., and Jonathan A. C. Sterne. Essential Medical Statistics, John Wiley & Sons, Incorporated, 2003. Page 423.

[2] PASS 16 Power Analysis and Sample Size Software (2018). NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, [ncss.com/software/pass](https://www.ncss.com/software/pass).



10.1.2. Análise de dados

10.1.2.1 Dados categóricos

Estes serão comparados usando o qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, conforme apropriado. As proporções brutas serão calculadas com intervalos de confiança exatos de 95% (IC, quando relevante).

10.1.2.2 Dados contínuos

Estes serão apresentados por medianas (IQR, faixas) e médias (desvios padrão, IC95%), conforme apropriado, e incluirão a contagem de parasitas e parâmetros laboratoriais. As comparações de dados contínuos serão avaliadas usando os testes t paramétricos / não paramétricos ou os testes de classificação de sinais / Mann Whitney u, conforme apropriado.

As análises dos dados do clareamento parasitário serão realizadas com o software disponível on-line pelo WWARN - PCE.

10.2 Braço II

10.2.1 Estimativa de cálculo amostral

Para demonstrar a prevalência de deleção dos genes *pfhrp2/3* (responsáveis pelos resultados falso-positivos do TR HRP2) nos indivíduos sintomáticos com suspeita de malária falciparum na faixa abaixo ou acima de 5%, e assumindo a prevalência de deleção de *pfhrp2* de 3.2% com base em estudo anterior, necessitaríamos de no mínimo 370 participantes (divididos entre os 2 centros de estudo).

10.2.2 Análise dos dados

Variáveis categóricas serão expressas em valores absolutos ou em porcentagem (%) e comparados com o teste exato de Fischer ou teste de Qui-quadrado. Variáveis contínuas serão expressas pela média ou mediana, de acordo com o padrão de distribuição de normalidade, e comparados através do teste Man—Whitney ou teste T. Intervalo de confiança de 95% será calculada para as proporções. Todas as análises estatísticas serão realizadas com o programa SAS (versão 9.3, SAS Institute, Cary, NC).

11. Divulgação de resultados

No final do estudo, o investigador principal apresentará um relatório sobre o estudo e seu principal resultado. Este relatório será compartilhado com o programa nacional de controle da malária e o Ministério da Saúde e permitirá formular recomendações e permitir que o Ministério da Saúde tome decisões informadas sobre se as atuais diretrizes nacionais de tratamento antimalárico devem ser atualizadas. Os dados do paciente serão incluídos no banco de dados da OMS global e WWARN.

Planejamos apresentar nossas descobertas em reuniões nacionais e internacionais. Além disso, publicaremos nossos resultados em periódicos de revisão por pares. As sessões de envolvimento da comunidade serão organizadas para manter uma participação ativa da comunidade. Discutiremos os resultados de nosso estudo com os líderes da comunidade local e os principais interessados que serão responsáveis por disseminar mensagens relevantes para a ampla comunidade.

12. Alterações ao protocolo

Após a aprovação do protocolo, nenhuma alteração poderá ser feita sem a aprovação do pesquisador principal, do patrocinador e dos Comitês de Ética.

13. Procedimentos de controle e garantia da qualidade

O estudo será conduzido de acordo com o atual protocolo aprovado, ICH GCP, quaisquer regulamentos nacionais que possam se aplicar a este estudo e procedimentos operacionais padrão. Este protocolo seguiu as diretrizes internacionais para a realização de estudos de eficácia terapêutica em regiões endêmicas da malária, conforme proposto pela OMS e WWARN.

O laboratório de Pesquisa Clínica em Doença Febril Aguda (INI / Fiocruz) será responsável pelo controle de qualidade / controle de qualidade. A função incluirá, mas não se limitará, ao monitoramento da aderência aos POPs para coleta de dados clínicos e amostras laboratoriais e verificações de qualidade (curadoria) dos dados clínicos e laboratoriais de acordo com as metodologias padrão. O controle de qualidade da lâmina da malária será realizado pelos departamentos parasitológicos em cada um dos locais do estudo.

14. Monitoria

Os locais de estudo devem ter um sistema para monitoramento interno. Além disso, o INI / Fiocruz monitorará regularmente todos os locais, de acordo com o ICH GCP e um Plano de Monitoramento. Os dados serão avaliados quanto à conformidade com o protocolo e precisão em relação aos documentos de origem. Os monitores verificarão se o estudo é realizado e os dados são gerados, documentados e relatados em conformidade com o protocolo, o GCP e os requisitos regulatórios aplicáveis.

15. Análise de risco

Tabela. Potenciais problemas de estudo e solução proposta

PROBLEMA POTENCIAL	SOLUÇÃO PROPOSTA
Atraso no início das atividades de estudo devido a atrasos nas aprovações éticas, compras e outros impedimentos logísticos	• Trabalhar com pessoal / agências relevantes, autoridades locais e nacionais, conforme necessário, para minimizar o impacto nos cronogramas do projeto • Se necessário, discuta com o financiador o reajuste da linha do tempo das entregas
Tamanho de amostra insuficiente ou inclusão mais lenta que o esperado	• Trabalhar com líderes comunitários locais, funcionários da unidade de saúde e outro pessoal relevante para identificar e abordar possíveis causas • Promover projetos de envolvimento da comunidade para envolver a comunidade nas atividades do estudo

	• Aumentar o número de locais clínicos (dentro da mesma área geográfica / populacional)
Limitações de espaço nas enfermarias médicas devido à intensidade do monitoramento da parasitemia	• Limitar o número de participantes inclusos em um determinado dia
Garantir o controle de qualidade dos medicamentos durante todo o período do estudo	• Enviar uma amostra do nosso lote de medicamentos em estudo para o laboratório nacional de controle de qualidade • Garantir que os medicamentos do estudo sejam armazenados em condições ideais de temperatura
Alta perda de acompanhamento	• Inclusão seletiva (ou seja, aqueles que residem em locais de estudo próximos; populações não móveis) • Fornecer incentivos indiretos aos participantes para diminuir a taxa de perda de acompanhamento • Reforçar a importância do acompanhamento completo da discussão sobre o CI, nas visitas de estudo e durante a hospitalização • Aumentar a equipe de visitas domiciliares (ou seja, trabalhadores comunitários de campo)
Eventos adversos e / ou violações de protocolo	• Reporte ao comitê de ética apropriado, financiador e patrocinador • A prevenção é apropriada por meio de alteração de protocolo e / ou treinamento de pessoal
Perda ou dano de amostras e isolados de sangue durante o armazenamento ou transporte	• Minimizar os riscos com o uso de equipamentos de boa qualidade, POPs e treinamento nos locais, assim como uso de correio bem estabelecido • Reservar uma parte de cada amostra nos locais de estudo, além do arquivo central do INI / Fiocruz
Garantir a contagem sanguínea de parasitas em série com qualidade garantida durante a admissão	• Reforçar a importância de aderir aos cronogramas de coleta de laboratório documentados nos POPs

16. Considerações éticas e confidencialidade dos participantes

16.1. Aprovação pelos comitês de ética institucional

Antes do estudo, a aprovação oficial para a realização do estudo será obtida no Comitê de Ética de Pesquisa em seres humanos do INI/Fiocruz, na CONEP e no CEP da UFRR, estando de acordo com a resolução 466/12 e as normas complementares. O investigador principal declara que este estudo vai ser conduzido em plena conformidade com os princípios da "Declaração de Helsinki" (alterada em Tóquio, Veneza, Hong Kong e África do Sul), a Conferência Internacional sobre Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos para Uso Humano (ICH) e as leis e regulamentos das regiões específicas. A dignidade humana será preservada pela adesão aos seguintes princípios éticos:

- Não-instrumentalização
- Privacidade: o princípio ético de não violar o direito à privacidade será assegurada;

- Não discriminação: os sujeitos envolvidos no estudo receberão igualdade de tratamento, a menos que existam razões médicas que justifiquem diferença de tratamento ou a distribuição de recursos de saúde;
- Consentimento informado: todos os sujeitos envolvidos no estudo deverão manifestar o seu consentimento após serem devidamente informados;
- O princípio da precaução: os pesquisadores vão respeitar o seu dever moral de avaliação de riscos contínua;

Antes do início do recrutamento dos participantes, as principais informações do estudo serão publicadas em [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (<https://clinicaltrials.gov>) e REBEC (<https://www.ensaiosclinicos.gov.br>). Além disso, publicaremos o protocolo do estudo em uma revista revisada por pares, a fim de aumentar a transparência da análise dos dados antes do início do estudo.

a. Consentimento informado por escrito

Os participantes serão incluídos no estudo somente se derem consentimento informado. A solicitação de consentimento, disponível em português, será lida inteiramente ao participante, caso não consiga ler. detalhes sobre o estudo e seus benefícios e riscos potenciais serão explicados. Depois que todas as perguntas forem respondidas, uma assinatura será solicitada no documento de assinatura. Se o paciente for analfabeto, uma testemunha alfabetizada deve assinar; se possível, o signatário será selecionado pelo participante em potencial e não terá conexão com a equipe de pesquisa. Declaração de consentimento por escrito para o teste de gravidez e a necessidade de contracepção também são necessárias para mulheres participantes em idade fértil.

b. Confidencialidade

Todas as informações sobre os participantes permanecerão confidenciais e serão compartilhadas apenas pela equipe do estudo. Identificadores exclusivos serão usados para entrada de dados em computador e amostras de sangue. Em todos os casos, o investigador principal garantirá que todos os formulários de triagem, os formulários de relatório de caso e a lista de códigos de identificação de pacientes preenchida (triagem de pacientes e diário de registro) sejam mantidos em arquivos bloqueados.

c. Assistência médica

Assistência médica gratuita durante todo o acompanhamento para qualquer doença relacionada à malária será fornecida aos pacientes do estudo, independentemente do resultado do tratamento; isso inclui quaisquer despesas relacionadas à internação hospitalar e a reações adversas a medicamentos, se necessário.

Quando se constata que participantes em potencial ou reais têm doenças não relacionadas à malária, o investigador principal deve aconselhá-los a obter ou encaminhá-los a obter atendimento médico.

Qualquer participante que decida não participar ou que não pode ser inscrito no estudo porque não atende a todos os critérios de inclusão não será inscrito. Ele ou ela serão encaminhados para a equipe da unidade de saúde e serão tratados para malária (se tiverem parasitemia) com os comprimidos AL FDC ou ASMQ FDC por 3 dias e / ou outras doenças. Essas pessoas serão tratadas e acompanhadas de acordo com o padrão de atendimento estabelecido pelo Ministério da Saúde. O investigador principal garantirá que essas combinações de medicamentos antimaláricos estejam disponíveis no centro de saúde. Pacientes com condições severas serão encaminhados para uma unidade de saúde apropriada para mais cuidados.

Se um participante for retirado do estudo antes de concluir o curso completo do tratamento, o médico deverá tomar todas as providências necessárias para fornecer ao paciente a dose completa do medicamento que seja apropriada em cada caso, de acordo com o tratamento nacional contra a malária. diretrizes.

d. Reembolso e compensação

Os participantes do estudo serão compensados pelo tempo perdido no trabalho. Os participantes receberão reembolso do custo do transporte local para comparecer às visitas de acompanhamento e receberão diárias para cobrir os custos das refeições nesses dias. Os valores em termos monetários serão determinados por cada site. O estudo pagará pelo tratamento de EAGs relacionadas a medicamentos ou outras lesões relacionadas a pesquisas.

17. Envio de amostra

As amostras coletadas serão utilizadas para os fins deste estudo, conforme estabelecido no protocolo. O consentimento será obtido de indivíduos para o envio de amostras específicas para instituições colaboradoras em investigações que não possam ser realizadas localmente, nomeadamente o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz), laboratório de Imunoparasitologia (IOC/Fiocruz), e o Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP). Quaisquer planos propostos para usar amostras que não sejam as investigações detalhadas neste protocolo serão submetidos aos comitês de ética relevantes antes de qualquer teste.

18. Cronograma de execução do estudo

Deve-se notar que o tempo que levará para conduzir a investigação dependerá: 1) do número de casos suspeitos de malária falciparum atendidos a cada semana nos locais do estudo; 2) a capacidade de aumentar a generalização e adicionar mais locais de estudo nos estados do Amazonas e Acre; e o 3) impacto colateral da epidemia de Covid em atrasar o recrutamento de participantes.

19. Orçamento

Recursos humanos		
• Equipe científica profissional		
• Equipe técnica		
• Suporte local		
Sub-total		50.000,00
Viagem e transporte		
Sub-total		20.000,00
Equipamentos e suprimentos		
• Equipamento		
• Suprimentos		
• Custos operacionais, aluguel de espaço, comunicação		
Sub-total		100.000,00
Taxas de contingência para estudos clínicos		
• revisão ética		
• seguro de responsabilidade civil		
Sub-total		10.000,00
Custos do paciente (incluindo testes de diagnóstico)		
Sub-total		20.000,00
Assistência técnica (treinamento, capacitação)		
Sub-total		5.000,00
Supervisão e monitoriamento (nacional e internacional)		
Sub-total		5.000,00
Sistema de Garantia da Qualidade (validação dos dados e verificação cruzada)		
Sub-total		5.000,00
Gerenciamento de dados (entrada de dados, análise de dados, relatórios)		
Sub-total		5.000,00
Apoio a laboratórios e institutos de pesquisa (genotipagem, marcadores moleculares, <i>in vitro</i>)		
Sub-total		50.000,00
Miscelânea		
Sub-total		
TOTAL		270.000,00