



HSD/CD/M/005-10
Original: Español

Guía práctica revisada para estudios de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas.



* Documento actualizado con las recomendaciones de la Reunión Técnica: Monitoreo in vivo de la eficacia de medicamentos antimaláricos, Iquitos, Perú, del 29 de septiembre al 3 octubre de 2003. Fecha de la versión anterior: enero 2003. OPS/DPC/CD/240/03

** Documento revisado y actualizado con las recomendaciones de la reunión técnica de resistencia a los antimaláricos, Ciudad de Panamá, Panamá del 11 al 16 de julio de 2010.

**Programa Regional de Malaria
Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles
Vigilancia de la Salud, y Prevención y Control de Enfermedades
ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD**

Agradecimientos

La OPS quisiera agradecerle al equipo internacional que preparó esta guía para la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a las Drogas Antimaláricas/ *Amazon Malaria Initiative* (RAVREDA/AMI), integrado por las siguientes personas en los países indicados:

Trenton Ruebush	Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Estados Unidos
Juan Carlos Ávila Rodolfo Villaroel	Bolivia
César Díaz Efraín Beltrán	Ecuador
Wilmer Marquiño César Cabezas Salomón Durand Jorge Zegarra Carola Salas Javier Cairo Nancy Arróspide	Perú
Stephen Vreden	Suriname

La guía fue preparada bajo los auspicios de la Red Amazónica para la Vigilancia de la Resistencia a las Drogas Antimaláricas (RAVREDA) de la OPS junta con la Iniciativa Amazónica contra la Malaria (IAM, o *Amazon Malaria Initiative/AMI*) de USAID.

Las siguientes personas fueron los integrantes del grupo de revisores de la última reunión en Julio de 2010.

CDC

Alexandre Macedo
Norma Padilla

OPS

Arletta Añez
Mayira Sojo Milano
Tamara Mancero
Wilmer Marquiño
Olivia Brathwaite
Keith Carter
Maria Paz Adé

Países

Stephen Vreeden (Surinam)
César Cabezas (Perú)
Oscar González (Panamá)
Carlos Victoria (Panamá)
Lisbeth Cerezo (Panamá)
Lourdes García (Panamá)
Elsa Arenas (Panamá)

Contenido

Introducción.....	1
Adecuación del protocolo estandarizado	2
Número de lugares de estudio.....	5
Selección de sitios para el estudio.....	6
El equipo de investigación.....	8
Coordinación antes del inicio del estudio	9
Preparación de insumos y materiales	10
Caja chica (gastos locales)	10
Formatos y cuadernos de registro	10
Registro de pacientes febriles y casos de malaria.....	10
Registro de citas para pacientes incluidos al estudio.....	11
Cuaderno de registro de laboratorio	12
Registro de gastos.....	12
La instalación del estudio	13
El reclutamiento y seguimiento de los pacientes	13
Preparación y manejo de las muestras de sangre.....	16
Preparación de las láminas y su codificación	16
Toma de muestras	16
Coloración.....	17
Transporte y almacenamiento de láminas	17
Control de calidad de las muestras tomadas	17
Microscopios	17
Contadores de células	17
Obtención de muestras para otras evaluaciones de laboratorio.....	18
Medición de niveles séricos de antimaláricos	18
Muestras para estudios de PCR.....	18
La supervisión.....	18
Reclutamiento de pacientes.....	19
Seguimiento de los pacientes	19
Informe económico	19
Finalizando el estudio.....	20
Costo de estudios <i>in vivo</i>	21
Preparación de la base de datos y análisis.....	21
Anexo I: Lista de materiales e insumos de campo necesarios para un estudio <i>in vivo</i> de 60 pacientes.....	22
Anexo II: Formato para resumir resultados de gota gruesa	24
Anexo III: Contexto epidemiológico.....	25
Anexo IV: Tabla resumen.....	25
Anexo V: Flujograma para estudios	26

Introducción

La resistencia del *Plasmodium falciparum* a los medicamentos antimaláricos es un problema que dificulta el control de la malaria en las Américas. En la actualidad, el *P. falciparum* es resistente a la cloroquina (CQ) y la sulfadoxina-pirimetamina (SP) en casi toda la región amazónica y a la CQ en la Costa del Pacífico de Sudamérica, siendo aún sensible a CQ en Centroamérica. Además, en los últimos años, varios investigadores han reportado infecciones de *P. vivax* con falla terapéutica a la CQ. Por la amenaza para la salud pública que representa la farmacorresistencia, varios ministerios de salud de la región han desarrollado estudios para conocer mejor la distribución e intensidad de la resistencia de *P. falciparum* y *P. vivax* a los medicamentos antimaláricos en sus territorios. Basado en los resultados de estos estudios de eficacia, los países han realizado cambios en sus esquemas de tratamientos de primera línea para infecciones no-complicadas de *P. falciparum* utilizando actualmente terapias combinados con derivados de la artemisinina.

Los estudios *in vivo* son considerados como el método de elección para proporcionar los datos necesarios para orientar cambios en la política de tratamiento de la malaria, debido a que se correlacionan mejor con la respuesta clínica de los pacientes a estos medicamentos. La Organización Mundial de Salud (OMS) ha publicado recomendaciones para estos estudios orientadas hacia áreas de alta transmisión, pero debido a los cambios epidemiológicos, recientemente también han sido publicadas recomendaciones con modificaciones apropiadas para áreas de baja o moderada transmisión, como es el caso de las Américas. En Sudamérica, los cambios en la política de medicamentos durante la última década se realizaron en seguimiento a los resultados de estos estudios *in vivo*.

Los estudios *in vivo* no requieren una tecnología sofisticada; sin embargo, no son sencillos de realizar. Requieren de un equipo clínico y de laboratorio con experiencia o bien entrenado que siga estrechamente el protocolo. Adicionalmente, es necesario la identificación de un laboratorio que pueda realizar pruebas de biología molecular, determinación en suero del medicamento y sus metabolitos y/o pruebas *in vitro*, si están indicados. Debido a la baja transmisión de malaria en los países de las Américas, muchas veces hay dificultades para completar el tamaño muestral requerido de pacientes con malaria por *P. falciparum*. En poblaciones dispersas y móviles, debe evaluarse la pertinencia y estrategia a utilizar para el desarrollo de estudios, garantizando el seguimiento y limitando al máximo el abandono.

Los estudios *in vivo* llevados a cabo en la última década en las Américas han usado los protocolos estándar basados en las recomendaciones de la OMS/OPS y específicamente el presente documento “Guía práctica para estudios *in vivo* de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas” elaborada en el año 2003. Esta guía, sirve como un complemento a los protocolos estándares y está basada en las experiencias con estudios de eficacia de los medicamentos antimaláricos realizados en la Región de las Américas. En razón a la experiencia acumulada en la implementación de los estudios, perfil epidemiológico, y nuevas orientaciones de la OMS, se hace necesario actualizar esta Guía Práctica.

Se espera que las recomendaciones de esta guía actualizada, junto con los protocolos genéricos actualizados en base al documento “Métodos para la Vigilancia de la Eficacia de los Antimaláricos”, coadyuvará a la realización exitosa de los estudios *in vivo*, los cuales deben fortalecer los sistemas de vigilancia de la eficacia de los medicamentos antimaláricos en la región.

Adecuación del protocolo estandarizado

El primer paso para llevar a cabo un estudio *in vivo* es preparar un protocolo aceptable para el(los) comité(s) científico/ético de la institución responsable por el estudio y de la entidad que brinde la asistencia técnica y/o el financiamiento. Para ayudar a los responsables de los estudios con la preparación de protocolos específicos para una región dentro del país, un país, o entre países de la región, existen protocolos genéricos actualizados. Estos protocolos están elaborados sobre la base de las normas de la OMS publicadas en el año 1996 para estudios *in vivo* de medicamentos antimaláricos con modificaciones del año 1998 para áreas de baja transmisión, e incluyen las últimas recomendaciones de la OMS del 2001, 2003 y 2009. Los protocolos genéricos actualizados se pueden encontrar en la página *Web* de la Organización Panamericana de Salud (OPS) en la siguiente dirección:

<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/mal-antimalarials.htm>.

Estos protocolos incluyen:

1. Cloroquina (CQ) sola, sulfadoxina-pirimetamina (SP) sola, o una comparación de CQ y SP para *P. falciparum*;
2. Mefloquina (MQ) y mefloquina-artesunato (MQ-AS) para *P. falciparum*; y
3. CQ para *P. vivax*.

Para completar estos protocolos, solamente se requiere que el responsable del estudio reemplace o complete las frases y los párrafos resaltados, ajustando el texto a la realidad de la epidemiología de la malaria y la eficacia de los antimaláricos en el país y a las características de la región y de la localidad donde se realizará el estudio.

Aunque estos protocolos fueron preparados para la evaluación de un medicamento o combinación de medicamentos específicos, se les puede modificar para un estudio de otros medicamentos parecidos. Por ejemplo, el protocolo para MQ-AS se puede modificar para un estudio de SP-AS y arthemeter/lumefantrina (AL). El estudio deberá tener una duración mínima de 28 o 42 días de seguimiento, dependiendo del esquema terapéutico a evaluar.

La introducción de la terapia combinada con base en derivados de la artemisinina para malaria por *P. falciparum* y otras estrategias de control empleadas en los países de la región han contribuido a disminuir la intensidad de la transmisión en muchos países, reduciendo y focalizando el riesgo en áreas geográficas definidas. En esta situación, se han tenido

dificultades para reclutar un número representativo de pacientes en los sitios a realizar el estudio, por lo que se hace necesario tomar en cuenta alguna de las siguientes recomendaciones formuladas en el documento “*Métodos para la Vigilancia de la Eficacia a los antimaláricos*” de la OMS del 2009 según la transición epidemiológica:

a. De alta a moderada transmisión

El límite inferior de parasitemia se ha reducido a 1000 parásitos/ μ L. Sin embargo, hay que considerar que en áreas de alta transmisión, las personas inmunes a menudo son portadoras asintomáticas de muy bajas parasitemias, las cuales pueden desaparecer espontáneamente conllevando a una subestimación de la falla terapéutica. Por otro lado, la lectura de las láminas debe ser muy precisa para evitar errores de clasificación de la falla terapéutica temprana, debido a que la falla se basa en la comparación de la parasitemia entre los días 0 y los días 2 o 3.

Otras modificaciones en el protocolo para áreas de alta transmisión incluyen el trabajo con un rango más amplio de edades, pasando la edad de reclutamiento de 6 meses a 15 años. Adicionalmente, la historia de fiebre en las últimas 24 horas en lugar de la fiebre confirmada al momento de la admisión, basta para que un caso cumpla los criterios de inclusión.

En la actualidad en la Región de las Américas no existen áreas que cumplan con esta clasificación de alta transmisión.

b. De moderada a baja transmisión

El límite inferior de parasitemia en estas áreas se ha reducido a 250 parásitos/ μ L. Esta reducción conlleva las mismas consideraciones aplicadas a lugares de alta transmisión: la lectura de láminas debe ser muy precisa, para evitar errores en la clasificación de la falla terapéutica temprana. El principal beneficio de reducir el límite inferior es que permite incrementar un aproximado de 30% el número de pacientes que pueden ser incluidos.

Si en un determinado país, al menos cuatro o cinco pacientes por semana no pueden ser incluidos en un sitio centinela, en un periodo de 6 meses, deberían considerarse otras alternativas, como realización de estudios multicéntricos.

c. De baja a muy baja transmisión

Para alcanzar el tamaño muestral requerido para un estudio, se puede combinar datos de estudios realizados en varios lugares dentro del mismo país o en varios países vecinos (estudios multicéntricos). Estudios con marcadores moleculares deberían realizarse simultáneamente con los estudios de eficacia terapéutica, utilizando marcadores conocidos y validados (mefloquina, sulfadoxina-pirimetamina y cloroquina).

En áreas donde la transmisión es muy baja, se sugiere que el monitoreo debería realizarse cada tres años en lugar de cada dos años. Los estudios con marcadores moleculares deberían realizarse sistemáticamente cada año.

Si para el país no es factible realizar pruebas de eficacia terapéutica cada tres años, la vigilancia debería basarse en otros elementos dentro de sistemas de alerta temprana, tales como estudios con marcadores moleculares o estudios *in vitro*.

d. De muy baja transmisión a pre-eliminación o eliminación

Los países que están en la etapa de pre-eliminación o eliminación deben iniciar la búsqueda activa de casos. Todos los pacientes (de todas las edades y todo nivel de parasitemia) deberían ser hospitalizados de ser posible hasta que su parasitemia y síntomas desaparezcan. A los países en etapa de pre-eliminación o eliminación se les recomienda hacer seguimiento de los pacientes por al menos 28 días y asegurar que no haya pérdidas en este seguimiento, la información sobre eficacia terapéutica puede ser fácilmente colectada de casi todos los pacientes. Las pruebas *in vitro* y los marcadores moleculares también pueden emplearse para el monitoreo de la eficacia de las drogas.

e. Todos los niveles de transmisión

La prevalencia de pacientes positivos al día 3 (D3 – día posterior a la finalización del tratamiento combinado basado en la artemisinina- TCA) se ha utilizado como un indicador clínico indirecto de la tolerancia o resistencia al artesunato en la frontera Tailandia-Cambodia. Este indicador no ha sido validado fuera de estos países y no puede considerarse un sucedáneo del monitoreo de la eficacia de la terapia combinada de artemisinina, la cual aun requiere la observación de las condiciones clínicas, a través de un seguimiento de 28 días (WHO, 2008). Sin embargo el seguimiento de la parasitemia de los pacientes al día 3 puede tener un valor predictivo de la eficacia a los derivados de la artemisinina.

En situaciones de altos niveles de fallas terapéuticas, en situación o no de epidemia, donde no es posible desarrollar un estudio *in vivo*, se debe considerar la obtención de muestras para pruebas *in vitro* y sus resultados podrán justificar/orientar el cambio o modificación del esquema de tratamiento para esa situación específica.

Otras consideraciones que se deben tener en cuenta son:

1. Estos estudios deben garantizar la vigilancia de la eficacia de los antimaláricos utilizados como primera y segunda línea para el tratamiento de la malaria por *P. vivax* y *P. falciparum* no complicada;
2. La única herramienta para comprobar la falla terapéutica son los estudios de eficacia *in vivo*;
3. Los estudios utilizando pruebas *in vitro* y marcadores moleculares son complementarios a los estudios *in vivo*;
4. Debido a la baja incidencia de casos, se recomienda realizar estudios de un brazo;
5. La duración de los estudios de eficacia no debe superar los 6 meses;
6. Incorporar como elemento obligatorio del protocolo la colecta de sangre en papel de filtro el día 0 y el día de falla terapéutica para diferencia los casos de recrudescencia y reinfección, mediante la genotipificación;
7. En estudios de monitoreo de eficacia de cloroquina (CQ) para malaria por *P. vivax*, se deberán tener las siguientes consideraciones:
 - La parasitemia deberá ser > 250 parásitos/microlitro de sangre,
 - Temperatura axilar de $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ al momento de captación, o historia de fiebre en las últimas 48 horas,
 - El período de seguimiento será por 28 días,
 - La administración de primaquina será el último día de seguimiento (Día 28)

- La clasificación de la respuesta terapéutica será la misma que la de *P. falciparum*,
- 8. Se debe considerar la medición de niveles en sangre completa de antimaláricos (priorizando los días 7 y día de falla al tratamiento, y día 28 de no existir falla al tratamiento) en todos los estudios de CQ en *P. vivax* (para toda la región) y *P. falciparum* (America Central y la Isla Hispañola, donde aun *P. falciparum* es sensible a la CQ), y en estudios de la combinación Artemeter-Lumefantrina para la Lumefantrina, mediante colección de 100 ul de sangre en papel filtro (Whatman 31ETCHR).
- 9. Debido a las bajas parasitemias esperadas, el monitoreo de la parasitemia al día 3 requiere de una buena experticia en microscopía;
- 10. La segunda lectura de la lámina de gota gruesa obtenida durante la identificación y captación del paciente, deberá ser leída en las primeras 24-48 horas de obtenida la muestra;
- 11. Es obligatorio realizar supervisión del 100% de la administración del tratamiento;
- 12. En situaciones especiales donde no es posible realizar un estudio *in vivo* (poblaciones móviles) se sugiere realizar el monitoreo de la parasitemia los días 2 y 3 de seguimiento. La no reducción o incremento de la parasitemia nos ayudaría a detectar que pudieran existir problemas con la eficacia del medicamento utilizado;
- 13. La detección precoz de variaciones en la susceptibilidad de los parásitos a los derivados de la artemisinina es posible mediante el uso de pruebas *in vitro* con las técnicas de ELISA (HRP2 o pLDH). Para la elección de la prueba se debe considerar su sensibilidad, especificidad, experiencia del uso en la región, y costo. Si bien la concordancia con la falla terapéutica (*in vivo*) no es buena para los antimaláricos en uso, esta técnica permite monitorear variaciones temporales en los valores de IC50 de los derivados de artemisininas y de otros medicamentos importantes como componentes de primera y segunda línea del manejo de casos de malaria grave (mefloquina y quinina). Varios medicamentos pueden ser monitoreados con la misma muestra de pacientes y las mismas placas, siendo más fácil lograr los tamaños de muestras requeridos por ser solo un contacto con el paciente. Lo cual es interesante en situaciones de baja transmisión. El problema está en que debe haber mucho rigor y disciplina en la estandarización y seguimiento del protocolo. Se propone identificar laboratorios de la región que tengan experiencia, cuyos equipos técnicos puedan brindar colaboración a los países.

Número de lugares de estudio

Un principio de la Estrategia de Vigilancia debe ser priorizar la calidad de los estudios sobre la cantidad, es mejor concentrar esfuerzos en pocos estudios muy bien realizados, siguiendo a rigor el protocolo de la OMS.

Generalmente, la resistencia a los medicamentos antimaláricos no varía mucho dentro de un área geográfica donde la epidemiología de la malaria es homogénea. Por ejemplo, no se han encontrado diferencias muy grandes en cuanto a los niveles o patrones de eficacia de los medicamentos antimaláricos en la Costa del Pacífico de América del Sur ni en la Amazonía.

Es recomendable que el sistema de vigilancia de la eficacia y la resistencia de los antimaláricos a través de los sitios de los estudios, sean parte de una red nacional y regional para obtener resultados concluyentes de los esquemas en uso de primera y segunda línea en cada área epidemiológica de las Américas

El número de sitios que se escogen tanto de alta como baja transmisión y tanto para estudios basales como para el monitoreo de la resistencia no deberán exceder de ocho para los estudios *in vivo* en un país o una región de un país y dependerá de:

- La epidemiología y ecología de la malaria (intensidad y estacionalidad de la transmisión, movilidad de la población, distribución y densidad poblacional);
- La accesibilidad geográfica;
- La información disponible sobre la resistencia/efectividad de los antimaláricos en el área;
- El propósito de los estudios (estudios basales o estudios que forman parte de una red de vigilancia de la eficacia de los antimaláricos);
- La capacidad de instalación de los sitios centinela (estructura física como un centro de salud, personal motivado y entrenado);
- La factibilidad de supervisión y monitoreo;
- El financiamiento para materiales y equipos necesarios, incluyendo disponibilidad de microscopios de buena calidad y vehículos o medios de transporte adecuados a la zona del estudio para el seguimiento, y el poder estimar y contar con el dinero necesario para los gastos locales y del estudio en general;

Idealmente, en las áreas fronterizas, los países vecinos deben coordinar el monitoreo de la eficacia de los antimaláricos entre los establecimientos de cada país considerando sus aspectos legales y administrativos, así como la movilidad de la población y la ecología compartida, un estudio realizado en cualquiera de los países fronterizos podría ser representativo del área geográfica

En zonas de baja transmisión donde no es posible realizar estudios en un sitio centinela por la dificultad en alcanzar el tamaño muestral, es recomendable realizar estudios multicéntricos dentro de un mismo país o entre países que compartan una misma situación epidemiológica y ecológica. El tamaño de muestra requerido para estudios multicéntricos no será el mismo que para el sitio centinela único y podrá requerir un cálculo diferente para la determinación del tamaño muestral.

Selección de sitios para el estudio

Uno de los factores críticos para el éxito de un estudio *in vivo* es la selección del área donde se desarrollará el estudio. Los criterios principales para seleccionar un área adecuada son:

1. Incidencia de la malaria por *P. falciparum* o *P. vivax* ;

2. Existencia de infraestructura adecuada de un establecimiento de salud
3. Accesibilidad y los medios de transporte dentro del área de estudio tanto para los residentes como para los miembros del equipo; y,
4. Seguridad y condiciones adecuadas de hospedaje y alimentación para el equipo de investigación.

Es importante mencionar que no se debe modificar o suspender las medidas de control que se estén implementando en el área solamente para hacer el estudio. Antes de iniciar un estudio *in vivo*, un miembro experimentado del equipo debe visitar la zona seleccionada para:

- Revisar los registros de malaria de los establecimientos de salud para definir la(s) localidad(es) que serán parte del área de estudio de acuerdo a la incidencia, densidad parasitaria y estacionalidad de la malaria.
- Identificar el establecimiento de salud adecuado para realizar el estudio que cuente con una infraestructura mínima de un área semi-privada para las entrevistas y los exámenes físicos, un área para la toma, coloración y examen de las muestras de sangre (que puede ser parte del laboratorio del mismo establecimiento de salud), y un área de espera para los pacientes antes de ser enrolados y durante su seguimiento.
- Si no está disponible un ambiente adecuado para atender a los pacientes del estudio, se debe pensar en adecuar un ambiente, pero esto llevaría más tiempo y se debe contemplar en el presupuesto de la investigación.
- Verificar la existencia de medios de comunicación (teléfono, radio o internet) y transporte disponibles
- Visitar a las autoridades de salud local y regional con el fin de informar y obtener el apoyo para realizar el estudio
- En coordinación con las autoridades de salud informar a los líderes de las localidades que habitan el área de estudio para obtener su apoyo
- Entrevistar al personal de los establecimientos de salud para saber el comportamiento de la gente en cuanto a cumplimiento con sus citas de control.

De ser posible, se sugiere no seleccionar hospitales ni establecimientos ubicados en zonas urbanas, ya que en estos se reciben casos derivados de otros establecimientos periféricos que ya han recibido tratamiento antimalárico. En las Américas, puede ser muy difícil contar con una muestra representativa de pacientes del área en estudio y cumplir con esta recomendación por los bajos niveles de transmisión, claros ejemplos son las poblaciones tan dispersas en áreas de la Amazonía y poblaciones móviles, reduciendo el número de sitios y sujetos potenciales para estudios.

En estos casos si no es posible hacer el seguimiento a los pacientes por el tiempo estipulado (28 y/o 42 días) se recomienda el uso exclusivo de otras pruebas alternativas como marcadores moleculares o pruebas *in vitro* para medir los cambios.

En localidades muy remotas o de difícil acceso para un estudio *in vivo*, hay que considerar:

- Abastecimiento de insumos suficientes para todo el estudio o definir el mecanismo para garantizar la existencia

- Enviar al lugar, un equipo con suficiente experiencia previa dadas las dificultades que se puedan presentar con la supervisión
- El costo del estudio se incrementa al mantener un equipo de investigación en un lugar remoto.

En situaciones particulares, cuando el sitio seleccionado incluya poblaciones móviles (ejemplo zonas mineras, etc.) se sugiere que:

- El reclutamiento y seguimiento de pacientes podría ser atendida por equipos móviles que se desplacen al lugar donde se encuentre dicha población.

El equipo de investigación

Aunque los estudios *in vivo* no son técnicamente complicados, requieren un equipo experimentado que pueda dedicar la mayor parte de su tiempo al estudio sin distracciones por otros compromisos. Por esta razón, es difícil que el personal del mismo establecimiento de salud de la localidad este a cargo del reclutamiento y seguimiento de los pacientes, si es que no pueden dedicar el tiempo suficiente para llevar a cabo el estudio. Sin embargo, vale la pena incluir en el equipo uno de los encargados del establecimiento de salud local para ayudar con la supervisión y aprender las metodologías del estudio, con la intención que esa persona pueda participar en estudios en el futuro que sean parte de la rutina de vigilancia de la eficacia de los antimaláricos en el país.

Para los estudios *in vivo* que forman parte de un sistema de vigilancia para la eficacia de los antimaláricos, estos deben repetirse cada 2 a 3 años dependiendo del contexto epidemiológico del lugar del estudio. Es recomendable que alguna institución nacional o regional mantenga dentro de su personal a algunos investigadores y técnicos con experiencia, de tal forma que puedan responsabilizarse del entrenamiento y supervisión de los nuevos equipos de campo y trabajadores locales durante el transcurso de un estudio. De esta forma se puede institucionalizar la vigilancia de la eficacia de los antimaláricos a nivel de los países.

El equipo de investigación debe estar conformado por: un responsable del estudio, un supervisor de campo, y un equipo mínimo por sitio de captación, inclusión y seguimiento de pacientes.

El responsable del estudio es la persona que coordina todos los aspectos relacionados con el estudio, desde el diseño, capacitación, implementación, análisis y hasta la diseminación de los resultados, y debe estar en todo momento involucrado en los procesos y toma de decisiones del estudio.

El supervisor de campo es la persona encargada de supervisar las acciones de implementación en el lugar donde se realiza el estudio.

El equipo mínimo por sitio de reclutación y seguimiento de pacientes consiste de un personal médico, uno de enfermería o técnico o auxiliar de enfermería y un microscopista. Este

equipo debe contar con apoyo de transporte, y todos sus integrantes deben tener un entrenamiento previo por parte de un personal experimentado antes de iniciar el estudio.

En circunstancias excepcionales, como en una región muy aislada, es posible que el personal médico o profesional de salud no pueda estar presente en todas las etapas del seguimiento de los pacientes, pero es necesario que si esté al momento del reclutamiento. Cuando el personal médico no está presente durante el seguimiento, el equipo que queda a cargo debe conocer muy bien los signos de peligro de la malaria grave y saber cómo atender al paciente hasta que pueda ser derivado a un hospital.

Una persona del equipo de investigación debe tener la responsabilidad de: medir el peso de los pacientes, administrar y observar todas las dosis de los antimaláricos y otros medicamentos, e informar a los pacientes acerca del seguimiento. El/ella debe ser capacitado/a y supervisado/a por el personal médico encargado, especialmente en el cálculo de las dosis y la administración de los medicamentos, especialmente a los niños menores, quienes pueden rechazarlos por su sabor amargo. Es recomendable que un miembro del equipo calcule la dosis de los medicamentos y que otro verifique el cálculo.

Un punto clave en este tipo de estudio es contar con un microscopista bien entrenado, de no ser posible, debe entrenarse a un microscopista semanas previas al inicio del estudio, y otro microscopista experimentado debe supervisarlo con una frecuencia no menor a cada 3-4 semanas para evaluar la calidad de las gotas gruesas, el diagnóstico por especie, y el recuento de la densidad parasitaria. Los problemas más comunes son gotas gruesas demasiado delgadas o gruesas, contaminación con hongos o bacterias, precipitación del colorante, o la falta de deshemoglobinización por la fijación de la gota gruesa por el calor.

Todas las gotas gruesas deben ser guardadas para una segunda lectura a realizarse más tarde por un microscopista experimentado, este sin conocimiento de los resultados de la primera lectura.

Es recomendable la coordinación con los promotores de salud, personas de la comunidad y líderes comunitarios para la identificación de pacientes y el apoyo del estudio.

En caso de establecerse un equipo móvil para el reclutamiento y el seguimiento de pacientes este deberá contar con el personal mínimo anteriormente descrito.

Coordinación antes del inicio del estudio

Idealmente, el estudio debe iniciarse entre 2 a 4 semanas antes del momento de mayor transmisión de la malaria. De esta forma, se espera captar con rapidez el número de pacientes necesarios para completar el tamaño de muestra del estudio calculado. Para lograr este objetivo, es necesario conocer el comportamiento estacional de la malaria en el/las área/s donde se realizará el estudio, vale la pena que el responsable del estudio se comunique periódicamente con el personal del establecimiento para averiguar si el número de casos de malaria está aumentando y será suficiente para el estudio. Si no es posible iniciar

el estudio inmediatamente antes de la época de mayor transmisión, se deberán tomar las precauciones para un estudio de duración más larga.

Preparación de insumos y materiales

Para el momento del inicio del estudio debe estar listo y bien capacitado el equipo de investigación. Teniendo en cuenta que debe preverse un tiempo para la compra y preparación de los insumos y materiales necesarios, el equipo debe hacer sus pedidos con unos 4 a 6 meses de anticipación y tener todo listo por lo menos unas 3 a 4 semanas antes de la fecha programada para iniciar el estudio. Es particularmente importante que los antimaláricos hayan pasado un control de calidad antes de iniciar el estudio y asegurar que la fecha de caducidad este vigente hasta después de finalizar el tiempo del estudio. El encargado del estudio debe registrar la fuente y el número de lote de cada medicamento antimalárico utilizado. El Anexo 1 tiene una lista de materiales e insumos para un estudio aproximado de 60 pacientes.

Dependiendo del acceso al sitio del estudio y de las dificultades del transporte, se debe considerar llevar consigo todos los medicamentos, materiales de laboratorio, y de escritorio necesarios cuando se movilice el equipo de investigación al sitio para iniciar el estudio. No se debe depender del establecimiento de salud para proporcionar los medicamentos. En lugares donde no hay acceso a la electricidad es recomendable la compra de un microscopio apropiado para las características del lugar.

Caja chica (gastos locales)

Con la experiencia de los estudios realizados en la región, ha sido muy útil tener una caja chica a cargo del equipo de investigación, esto, para el reembolso de costos de pasajes a los pacientes, y para la compra de insumos y/o medicamentos imprevistos. Esta cantidad de dinero variará dependiendo del lugar del estudio, por lo que se aconseja que el responsable del estudio realice un análisis de costo antes del inicio del mismo.

Formatos y cuadernos de registro

Para facilitar el trabajo del equipo encargado del reclutamiento y seguimiento de los pacientes en el campo, se ha usado algunos registros que no figuran como tales en el protocolo. Para preparar estos registros, se pueden utilizar cuadernos de 50 a 100 hojas.

Registro de pacientes febriles y casos de malaria

El equipo de trabajo podrá obtener del registro diario del establecimiento de salud, los datos de los pacientes febriles y con diagnóstico de malaria que se atienden diariamente en el establecimiento. De este registro se podrá obtener la lista con las variables de la tabla 1, si el diagnóstico de malaria fue positivo o negativo, si el paciente fue ingresado al estudio o no, y en dicho caso, el motivo de exclusión.

Tabla 1: Registro de pacientes febriles y casos de malaria

Fecha	Nombre y Apellidos	Edad	Sexo	Diagnóstico (+/-; especie)	Incluido al estudio (Sí/No)	Motivo de exclusión

Registro de citas para pacientes incluidos al estudio

Luego de incluir varios pacientes al estudio, se hace complicado recordar cuales pacientes tienen que acudir en un día determinado para su control clínico y de gota gruesa. Por este motivo, el equipo a cargo del seguimiento de los pacientes debe contar con un cuaderno de citas. El mismo día que un paciente es incluido al estudio, las fechas de sus citas futuras deben ser anotadas en este cuaderno por el equipo. Se usará una página para cada día y se escribirá el código del paciente abajo del día de su control. Ver abajo en la tabla 2: Registro de citas, un ejemplo de una de las hojas de este cuaderno del 7 de junio en que los pacientes J037 y J038 tienen su control del Día 1, el paciente J034 su control del Día 3, los pacientes J026, J027, J028, y J029 su control del Día 14, etc. Cuando el paciente acude o es ubicado para su control de ese día, se tacha el código del paciente. Este cuaderno también permite al equipo prever y controlar la carga de trabajo diario. Debido a la importancia de citar a los pacientes para sus controles en los días que corresponden, es crítico que las fechas en este cuaderno sean correctas, evitando saltar días del calendario o agregar días extras.

Tabla 2: Registro de citas

7 de junio del 2002 (fecha de la cita)

Día 1* J037** J038	Día 14 J026 J027 J028 J029
Día 2	Día 21 J008 J009 J010
Día 3 J034	Día 28
Día 7	

*Día de seguimiento, **Código del paciente

Cuaderno de registro de laboratorio

El encargado del laboratorio debe tener un cuaderno de registro para los resultados de las gotas gruesas. Este cuaderno debe ser llenado diariamente. Al finalizar el día, el personal médico a cargo del estudio revisará el cuaderno y anotará en la ficha clínica correspondiente del paciente los resultados obtenidos. Un ejemplo de una página de este cuaderno puede verse en las tablas 3 y 4 a continuación.

Tabla 3: Registro de lecturas de gota gruesa

ID #	Día	Fecha	Resultado	Especie	Parásitos asexuales	Leucocitos	Parásitos/ μ L	Gametocitos	Gametocitos/ μ L	Comentarios
J001	D7	22-jun.-02	-							
J002	D7	"	-							
J003	D3	"	+	F	33	217	912	0		
J004	D0	"	+	F	295	205	8634	0		
J005	D0	"	+	F	380	201		0		

Tabla 4: Registro de primeras y segundas lecturas

ID #	Día	Fecha	Primera lectura asexuados	Segunda lectura asexuados	Tercera lectura	Promedio	Primera lectura gametocitos	Segunda lectura gametocitos	Tercera lectura gametocitos	Promedio	Observaciones
J001	D0	25-04-01	2163	1934	-	2049	-	-	-	-	
J002	D0	14-05-01	1693	510	594	552	-	-	-	-	
J003	D3	15-06-01	2569	2800	-	2685	5	4		5	
J004	D14	23-06-01	-	-	-	-	125	23	150	138	

También en este cuaderno se registra las densidades de las primeras y segundas lecturas efectuadas por los microscopistas. Esta información permitirá ver el grado de concordancia o discordancia de las lecturas (1^{era} y 2^{da}) y permitirá tomar la decisión de proceder a una tercera lectura según los criterios sobre control de calidad de la microscopia establecidos en el protocolo del estudio.

Registro de gastos

Para la administración de los fondos de la caja chica, es útil llevar un cuaderno donde se registren los gastos locales de pasajes, insumos, medicamentos comprados u otros imprevistos. De ser posible, se debe guardar y adjuntar los recibos o facturas de las compras.

En los protocolos genéricos se incluye un ejemplar de la ficha clínica del paciente que contiene los datos mínimos que deben ser recolectados para hacer comparables los estudios en cada uno de los países de la región, pero los grupos de investigación podrían incluir en dicha ficha otros datos que consideren pertinentes, cuidando que contribuyan a los objetivos del estudio.

La instalación del estudio

Normalmente, al llegar a un sitio nuevo para realizar un estudio *in vivo* se necesitará un día o dos para acondicionar el ambiente. Para la atención de los pacientes se necesitará de un lugar con un mínimo de 3 a 4 sillas, una mesa y una camilla para el examen físico de los pacientes. En algunos casos varios pacientes acuden al mismo tiempo, por lo tanto es recomendable tener una banca o varias sillas extras donde los pacientes y sus familiares podrán sentarse mientras están esperando. Para la obtención de muestras, el personal de laboratorio debe contar con una mesa y dos sillas. Idealmente, el lugar de toma de las muestras de control deberá estar cerca del lugar donde se atenderán a los pacientes, pero, si se tomaran muestras para determinación de niveles de medicamentos, la obtención de estas deberá realizarse en un ambiente separado de donde se administren los medicamentos, para no correr el riesgo de contaminar las muestras. No es necesario tener un ambiente separado para la obtención de muestras de sangre para PCR pero si se debe tener mucho cuidado en determinar un área completamente limpia con uso de desinfectantes.

Es complicado fraccionar bien las tabletas de cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, y mefloquina para adecuar la dosis al peso del paciente. Es recomendable aplicar las buenas prácticas de almacenamiento y de fraccionamiento de los medicamentos para asegurar las dosis correctas de los medicamentos. Además de los medicamentos antimaláricos, el equipo deberá contar con otros medicamentos básicos, como antipiréticos y antieméticos. En una mesa de trabajo se deberá contar con un recipiente con agua potable y vasos desechables para la administración de los medicamentos. Para evitar que los pacientes tomen los medicamentos con el estómago vacío, se deberá tener algún tipo de alimento como por ejemplo galletas dulces o saladas.

En un lugar visible del sitio del estudio, se deberá pegar el flujograma del estudio lo cual facilitará a los miembros del equipo seguir los procedimientos del protocolo para cada paciente ingresado al mismo. En el anexo 3 puede verse un ejemplo de flujograma.

El reclutamiento y seguimiento de los pacientes

En muchos países de las Américas es posible simplificar la selección inicial de los pacientes con malaria porque a todo paciente febril en zonas endémicas para malaria, se le realiza un análisis para toma de gota gruesa y diagnosticar si es positivo o no y que parásito transmisor de la malaria está presente. De ser este el caso, es posible que el microscopista del equipo realice el conteo de parásitos directamente de la muestra tomada por el establecimiento. Si la muestra es de mala calidad, será necesario repetir la gota gruesa para un mejor conteo de la densidad parasitaria. Es recomendable leer la segunda lámina de gota gruesa dentro de las 24 horas de tomada la muestra.

Según las recomendaciones de la OMS para los estudios *in vivo* de *P. falciparum*, uno de los criterios de inclusión es una densidad parasitaria mínima de 1,000 parásitos asexuados/ μ L. Sin embargo, en las Américas, muchos pacientes presentan baja parasitemia al llegar al establecimiento de salud y tendrían que ser excluidos si se utilizara esta densidad como limite inferior. Basados en la experiencia de la aplicación de estos estudios de eficacia

en la Región de las Américas para las especies de *P. vivax* y *P. falciparum* se tomó como límite inferior una densidad parasitaria mínima de 250 parásitos asexuados/ μ L. Disminuir aun más la densidad parasitaria mínima dificultaría la posibilidad de observar cambios en la densidad de parásitos luego de iniciado el tratamiento.

Antes de incluir a cada paciente al estudio, el personal a cargo del reclutamiento de pacientes, a través de una conversación con el paciente, deberá informar sobre el estudio, naturaleza e implicación de su participación, y luego invitarle a participar en el mismo.

De estar dispuesto a participar se le explicará el contenido del consentimiento informado, para que si el paciente este de acuerdo pueda firmarlo y pasar a ser parte del estudio. En caso de que este sea un menor de 18 años se deberá contar con el asentimiento del menor y consentimiento de los padres o protectores.

La experiencia ha demostrado que es preferible incluir solamente pacientes que son residentes permanentes en la localidad donde se realiza el estudio, o dentro de un máximo de 30 ó 45 minutos a pie o por río de la localidad. Si vienen de caseríos más distantes, aumenta la probabilidad que los pacientes no acudan para todos sus controles. En la Amazonía, por las amplias distancias, puede ocurrir que residentes de otras comunidades que están alojándose con sus parientes en la comunidad del estudio se enfermen. Aunque sería fácil incluir a estos pacientes, muchas veces es mejor no hacerlo, ya que al sentir mejoría de sus síntomas normalmente estos regresan a sus lugares de origen y abandonarían el seguimiento. A pesar de estas situaciones deberá evaluarse la factibilidad de la realización de los estudios y para ello podrán utilizarse los equipos móviles descritos en la sección de equipo de investigación.

En localidades en proceso de eliminación, la detección de un caso pudiera recomendar la hospitalización de este, por lo cual la hospitalización los pacientes es recomendada en situaciones de eliminación.

No existe un límite máximo para el número de pacientes que puedan ser incluidos en un solo día, aunque la experiencia demuestra que, generalmente, es difícil incluir y seguir más de 5 pacientes por día cuando este ritmo de inclusión de pacientes se mantiene día tras día. Es útil elaborar una lista de chequeo para asegurar que el equipo cumpla adecuadamente con los requisitos del reclutamiento y seguimiento de los pacientes.

Las fichas clínicas deberán ser llenadas cuidadosamente por el miembro del equipo encargado del estudio, con letra legible. Si se cometieran errores en el llenado de la ficha, estos deberán tacharse con una línea sencilla, y sobrescribir la información correcta, registrando también la fecha y las iniciales del responsable. El equipo del estudio tiene la responsabilidad de mantener las fichas de los pacientes al día, con todos los datos clínicos y de laboratorio y de guardarlas en un lugar seguro hasta que finalice el mismo.

Todos los pacientes incluidos en el estudio deberán tener un número de código, generalmente empezando con 01 o 001 (según tamaño de la muestra si se espera contar con dos dígitos o tres dígitos), es recomendable incluir las iniciales del establecimiento de salud en el código del paciente para identificar el lugar de realización del estudio, por ejemplo, "SJ007," para el séptimo paciente del Centro de Salud San Juan.

Para asegurar que todos los controles de los pacientes se hagan en los días de seguimiento indicados, es recomendable citar a los pacientes para sus controles en las primeras horas de la mañana. De esta forma, se sabe al mediodía si el paciente va a regresar o no y es posible visitarlo en su domicilio por la tarde. Debido al problema de buscar en horas de la noche a los pacientes que no acuden a sus citas, especialmente en las localidades sin luz eléctrica, es recomendable hacer estas visitas no más tarde de las 17:00 horas. Para facilitar la búsqueda del paciente en su domicilio, al momento de reclutarlo se debe anotar cuidadosamente en su ficha clínica la ubicación de su domicilio y algunos puntos de referencia que faciliten su ubicación, como iglesias, escuelas, tiendas, etc. Cuando hay problemas en ubicar a un paciente, se puede recurrir para ayuda al personal del establecimiento que generalmente conoce los domicilios de la mayoría de las personas. Si hay transporte disponible, puede arreglarse el traslado del paciente a su casa después de la primera visita para asegurar que alguien del establecimiento de salud conozca la ubicación de la casa.

Para facilitar que el paciente recuerde la fecha de su cita se le debe entregar una tarjeta donde se anotará la fecha de sus próximas citas tratando de que quede protegida en una bolsa plástica. Esta tarjeta también es útil como identificación del paciente para facilitar su ingreso al establecimiento de salud.

Ministerio de Salud Centro de Salud San Juan	
Paciente: Juan Peres Ramos	
Control 1: jueves 3/07	Acudir a las 8:00 AM ✓
Control 2: viernes 4/07	Acudir a las 8:00 AM ✓
Control 3: sábado 5/07	Acudir a las 8:00 AM ✓
Control 4: miércoles 9/07	Acudir a las 8:00 AM
Control 5: miércoles 16/07	Acudir a las 8:00 AM
Control 6: miércoles 23/07	Acudir a las 8:00 AM
Control 7: miércoles 30/07	Acudir a las 8:00 AM
Dr. Pedro Paredes	

Considerando el tiempo y esfuerzo que el equipo tiene que invertir en el seguimiento de los pacientes que no regresan para sus controles, es costo-efectivo rembolsar el pasaje al paciente para que acuda por sí mismo al establecimiento o ir a buscarlos personalmente, lo que muchas veces resulta más caro y difícil. Como incentivo para que el paciente acuda al establecimiento a sus controles el Día 14 y el Día 28, algunos investigadores han usado pequeñas retribuciones (por ejemplo, bolsas de víveres como ser arroz, azúcar, o leche en polvo, frascos de aceite, enseres plásticos, entre otros.). No se debe mencionar estas retribuciones al paciente el día de su reclutamiento al estudio para no influir en su decisión de participar. Cuando un paciente no acude a su cita de control y es ubicado en su domicilio se le debe recomendar que acuda al establecimiento de salud para la siguiente cita, porque de

no recomendarle esto, el paciente puede confiar que se le buscará en su casa para los demás controles.

En áreas como la Amazonía donde la población es muy dispersa, es difícil lograr las visitas de control en la fecha exacta de la cita. Si un paciente no acude el día de su cita y no es encontrado ese día en su domicilio, es posible hacer el control al día siguiente. Se debe anotar en la ficha del paciente la fecha del control y los datos se pueden ajustar al momento de hacer el análisis. Debido a estas dificultades con el seguimiento, es aceptable tener una variación de más o menos un día para los controles de los días 7, 14, 21 y 28.

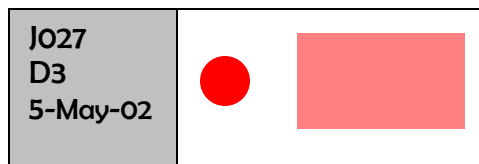
Debido a la baja transmisión de la malaria en las Américas, los equipos a veces tienen que hacer un esfuerzo especial para encontrar suficientes pacientes para un estudio. Por ejemplo, en algunas comunidades los promotores de salud locales administran antimaláricos a los pacientes febriles antes que lleguen a los establecimientos, y por lo tanto estos pacientes nunca acuden al establecimiento. En estas localidades se puede hacer una búsqueda activa de pacientes febriles, tomarles una gota gruesa y de ser positivos y cumplir con los criterios de inclusión, invitarlos a participar en el estudio. Aunque es posible encontrar parasitemia en personas que no tienen fiebre, la parasitemia probablemente será baja y por lo tanto no vale la pena tomar gotas gruesas de personas afebriles.

Preparación y manejo de las muestras de sangre

Preparación de las láminas y su codificación

La identificación y la conservación adecuada de las láminas de gota gruesa y frotis son importantes para el éxito del estudio. Se puede usar cualquier tipo de lámina, pero las láminas con borde esmerilado permiten rotularlas adecuadamente. La lámina debe ser rotulada con el código del paciente, el día de control (D0, D2, D3, etc.) y la fecha en que se toma la muestra. Un ejemplo de una lámina correctamente rotulada se muestra en la figura 1.

Figura 1



Donde “J,” es una clave asignada al nombre del establecimiento o lugar del estudio, “027” corresponde al número del paciente, “D3” al día de control 3, y finalmente la fecha en que fue tomada la muestra. Todas las láminas, aun las nuevas, deben ser adecuadamente lavadas antes de ser utilizadas.

Toma de muestras

Luego del reclutamiento del paciente al estudio se le realizará una buena punción digital para evitar doble punción. Es recomendable el uso de lancetas pediátricas automáticas

en caso de tener que ingresar niños muy pequeños al estudio. De una muestra de sangre de cada paciente se realizarán dos láminas con gota gruesa y frotis o extendido al lado de la gota gruesa, y se recolectará la muestra para papel filtro. Esto permitirá discernir adecuadamente la tipificación de especie en caso de infecciones mixtas u otras dificultades ya que se podrá observar el parásito dentro y fuera de los glóbulos rojos. Una vez ejecutada la gota gruesa es necesario fijar el frotis con metanol pero al mismo tiempo se debe cuidar de no fijar la gota. Mantener las gotas gruesas recién tomadas en posición horizontal hasta que la sangre se seque y protegerlas de inmediato para evitar que la sangre sea consumida por insectos.

Coloración

Preparar la solución trabajo de Giemsa (1/10) al momento de efectuar la coloración y colorear las láminas tan pronto sequen para evitar que las láminas se fijen por efecto del calor del medio ambiente. Filtrar el colorante periódicamente. Usar soluciones buffer si la calidad de agua no es buena. Almacenar adecuadamente la solución stock de Giemsa.

Transporte y almacenamiento de láminas

Para transportar las láminas adecuadamente se puede usar “portaláminas de cartón tipo carpeta” que resultan prácticas porque permiten el secado de la muestra en posición horizontal y evitan que las láminas se quiebren. Gotas gruesas todavía no teñidas deben ser protegidas de los insectos. En áreas con alta humedad, como en la Amazonía, las láminas deben ser almacenadas en cajas portaláminas con preferencia de plástico con cierre hermético para evitar que se contaminen con hongos, también pudiera utilizarse una fuente de luz para mantener las láminas secas y prevenir la contaminación por hongos. En el campo el orden para almacenar las láminas es por fechas, aunque al terminar la primera y segunda lectura y de resolver las discordancias, estas deberán ser finalmente agrupadas por paciente. Se deberá considerar un tiempo de almacenamiento de todos los formatos y las láminas realizadas durante el estudio, este tiempo deberá disponerlo el responsable del estudio.

Control de calidad de las muestras tomadas

La supervisión del estudio debe incluir una revisión de una muestra de las gotas gruesas tomadas para confirmar el diagnóstico y el cálculo de la densidad parasitaria. La frecuencia de la supervisión depende de la experiencia del equipo que está en el campo reclutando pacientes. Si el equipo es experimentado una supervisión al inicio, mitad y cierre del estudio deberá ser suficiente.

Microscopios

Se debe contar con microscopios binoculares con un objetivo de 100x, de tener luz incorporada contar con focos de iluminación de repuesto para su recambio en caso necesario. Es importante mantener la limpieza y el mantenimiento del microscopio para asegurar su buen funcionamiento y evitar su contaminación con hongos.

Contadores de células

Debe preverse dos contadores manuales por microscopista o en su defecto un contador tipo piano por microscopista y chequear el buen funcionamiento de los mismos durante el estudio.

Obtención de muestras para otras evaluaciones de laboratorio

Medición de niveles séricos de antimaláricos

Se deberá medir los niveles séricos de antimaláricos al día 7 y día 28 o día de falla mediante colección de sangre en papel filtro (Whatman 31ETCHR) en todos los estudios de CQ en *P. vivax* y *P. falciparum* (America Central) y en estudios de la combinación Artemeter-Lumefantrina para la Lumefantrina.

Obtención de muestras para otros estudios (in vitro)

Muestras para estudios de PCR

El laboratorista debe conocer el protocolo de reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en ingles PCR a ser utilizado en el estudio, para tomar las muestras de sangre de acuerdo a este. En caso de que el protocolo utilice muestras de sangre total, estas deben tomarse en tubos de *microtainer* y mantener una cadena de frío hasta que las muestras lleguen al laboratorio donde serán procesadas. En caso de trabajar con sangre impregnada en papel filtro definir previo al estudio en que tipo de papel filtro se va a impregnar la muestra de sangre parasitada, ya que los protocolos de extracción de ADN son específicos para el tipo de papel de filtro que se usa. Las muestras son almacenadas en bolsas plásticas con uso de desecante para protegerlas del efecto de la humedad.

Estas muestras nos servirán para diferenciar la recrudescencia de la reinfección, sin embargo también nos serán útiles en un futuro para determinar la presencia de marcadores moleculares asociados a la resistencia de los antimaláricos.

La supervisión

La supervisión periódica del estudio es fundamental para asegurar que todo vaya bien y para corregir cualquier error. La frecuencia de supervisión depende de la experiencia del equipo. La persona que hace la supervisión debe tener experiencia previa con estudios *in vivo* e idealmente, debe tener experiencia en el examen de gotas gruesas y el conteo de parásitos, así mientras realiza la supervisión puede revisar una muestra de las gotas gruesas tomadas para confirmar el diagnóstico y el cálculo de la densidad parasitaria. Si el supervisor no pudiera realizar esto, seria necesario la supervisión por un microscopista experimentado.

Es recomendable iniciar la visita de supervisión con una reunión con todo el equipo del estudio para explicar los procedimientos de la visita y platicar de los métodos que están usando para la identificación, reclutamiento, tratamiento, y seguimiento de los pacientes y los problemas que han encontrado. El supervisor debe revisar cuidadosamente cada ficha clínica. Si se encontraran errores, estos deberán ser revisados con el personal médico a cargo de la identificación y reclutamiento de los pacientes y, si es necesario, hacer correcciones tachando el error y sobrescribiendo la información correcta con la fecha e iniciales del personal médico. Una lista de chequeo hace más fácil la supervisión y asegura que no se olvide nada de importancia:

Reclutamiento de pacientes

- ¿El equipo de investigación tiene una buena comunicación con el personal del establecimiento que capta los pacientes febriles? ¿Cómo se captan los pacientes febriles? ¿Se anotan los pacientes febriles en el cuaderno apropiado?
- ¿Es adecuado el trato de los pacientes durante la identificación y reclutación?
- ¿Se están reclutando pacientes con malaria no complicada?
- ¿El ambiente donde se reclutan los pacientes es adecuado (consultorio, laboratorio, sala de espera)?
- ¿Quién y dónde se toman las muestras para gotas gruesas? ¿Las gotas gruesas son de buena calidad en cuanto a tamaño, grosor, y tinción? ¿Se respetan las normas de bioseguridad?
- ¿Se están siguiendo correctamente los criterios de inclusión/exclusión del protocolo?
- ¿Son correctos el diagnóstico por especie y las densidades parasitarias que informa el microscopista?
- ¿Se toman todas las muestras necesarias según protocolo? (revisar el flujograma)
- ¿Las muestras para estudios moleculares y para pruebas *in vitro* se toman de manera adecuada y en el lugar adecuado?
- ¿Las fichas de los pacientes captados e incluidos tienen todos los campos llenos?
- ¿Las muestras son correctamente rotuladas y conservadas adecuadamente?
- ¿Todas las dosis del medicamento son supervisadas por un miembro del equipo?
- ¿El equipo esta pensando en los pacientes y calculando correctamente la dosis de los medicamentos?
- ¿Se están cumpliendo adecuadamente los preceptos éticos exigidos en el protocolo del estudio? ¿Se están cumpliendo y explicando adecuadamente los procedimientos para el llenado de los formatos de consentimiento informado?

Seguimiento de los pacientes

- ¿Se anota la dirección de los pacientes en forma suficientemente detallada para encontrar su casa?
- ¿Se está administrando a los pacientes las dosis correctas del antimalárico?
- ¿Se llena adecuadamente el cuaderno de citas?
- ¿Los miembros del equipo reconocen los signos de malaria grave? ¿Se está preparado para atender una emergencia por malaria grave o para derivar a estos pacientes?
- ¿Cuál es el porcentaje de pacientes a los que es necesario buscarlos en su domicilio?
- ¿Se cuenta con lo necesario para el seguimiento de los pacientes?
- ¿Cuáles son las causas para el abandono de los pacientes? ¿Es necesario alguna nueva medida para disminuir el abandono de los pacientes?

Informe económico

- ¿Se llena el cuaderno de gastos diariamente?
- ¿Cuadran los registros de gastos con en dinero entregado y los saldos?
- ¿Es necesario mayores fondos de caja chica?

Al terminar la supervisión, se debe conversar con el equipo para felicitarlo por su trabajo, para corregir posibles errores que se estén cometiendo y para responder a sus preguntas o dudas si las hay. Se recomienda supervisiones quincenales durante el primer mes

de instalado el estudio, y luego visitas mensuales hasta su culminación. Una visita de supervisión adecuada de un estudio *in vivo* normalmente lleva un mínimo de 3 días.

Es recomendable que el equipo de investigación en el campo envíe breves informes semanales o quincenales a los responsables del estudio. En estos informes se debe detallar el número de pacientes febriles, casos de malaria diagnosticados, el número de casos captados e incluidos, el número de fracasos, el retiro de pacientes del estudio y sus causas, y si hubiera problemas del entorno que puedan poner en riesgo la continuación del estudio, asimismo un informe de lo que resta en la caja chica. Este informe puede enviarse por teléfono, teléfono móvil, fax, correo electrónico u otra herramienta disponible de comunicación, según la situación en el lugar de estudio.

Finalizando el estudio

Antes de retirarse por última vez del sitio del estudio, debe haber una revisión general de las fichas clínicas de los pacientes para cerciorarse que no hay un dato olvidado o equivocado como la edad o el sexo de un paciente. Es necesario asegurarse que se esta recolectando todos los archivos y la otra información necesaria para elaborar el informe final y un artículo científico. También, se debe recoger el equipo y los materiales del estudio, aunque en algunos casos se puede entregar los insumos restantes al establecimiento de salud y agradecerles por su colaboración. Antes de dejar la comunidad, el responsable del estudio o uno de los miembros del equipo debe despedirse y agradecer al personal del establecimiento de salud así como a las autoridades locales, y proporcionarles los resultados preliminares del estudio. Una reunión social al final del estudio es una buena forma de reconocer la colaboración y ayuda del personal local.

Al finalizar el estudio (trabajo de campo), el responsable del estudio o uno de los miembros del equipo debe también visitar a las autoridades de salud distrital/regional para informarles de los resultados de la investigación y avisarles de cuando pudieran recibir el informe final escrito.

El equipo de campo debe elaborar un informe final de su trabajo, incluyendo el número de pacientes febriles examinados, el número de pacientes reclutados, el número de excluidos y sus causas, y la proporción con fracasos parasitológicos y/o terapéuticos según las clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se encuentran en el sitio Web de la OMS:

<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241597531/en/index.html>. Además, se debe incluir un informe de los gastos del equipo de campo por rubros como pasajes, medicamentos, combustible u otros gastos. Si hay recomendaciones para futuros equipos trabajando en la misma zona, valdría la pena incluirlas en el informe también.

El procesamiento de las muestras complementarias obtenidas durante el reclutamiento e inclusión y seguimiento de los pacientes se deberán realizar en los lugares elegidos, según cronograma establecido en el protocolo de investigación. Se deberá evaluar la pertinencia de su inclusión en el informe final.

El informe final del estudio debe tener la estructura de un artículo científico (resumen, introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones, recomendaciones, y bibliografía). En la sección de los anexos, se deberá incluir los instrumentos utilizados para la recolección de la información. Se deberá asegurar la conservación de los instrumentos de recolección de la información (fichas clínicas, consentimientos informados, resultados de laboratorio entre otros), lo mismo que las muestras biológicas recolectadas y los resultados obtenidos, por un período determinado de tiempo según este establecido por las normas éticas y administrativas del país, países u organizaciones participantes.

Costo de estudios *in vivo*

Basándose en la experiencia de la región en la realización de los estudios *in vivo* durante la última década, un estudio de 28 días tiene un costo aproximado de entre 15 y 25 mil dólares americanos, dependiendo de la ubicación y accesibilidad para la supervisión de los sitios. Por ello se recomienda la realización de un estudio de costos antes del inicio del estudio *in vivo*.

Preparación de la base de datos y análisis

Antes de ingresar las fichas en una base de datos, es necesario que un miembro del equipo revise cada ficha. En esta revisión se deben buscar errores como: discordancias en los datos que figuran en más de una página, en el sexo del paciente con su nombre, en el peso del paciente para la edad, en la dosis de medicamento administrada conforme al peso u otros datos que estén ausentes o incompletos. Esta revisión servirá también para estandarizar algunos términos utilizados para describir síntomas (por ejemplo, cefalea y dolor de cabeza, o nombres de medicamentos comerciales por el nombre genérico de los mismos).

La OMS ha diseñado un formato para la creación de una base de datos con la información obtenida en el estudio, para facilitar su ingreso y análisis. Este formato está disponible en la siguiente dirección electrónica:

<http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/mal-instrument-exercise-who.htm> Este formato exige una doble digitación de la información y permite hacer el análisis de sobrevivencia (Kaplan Meier). Adicionalmente, con la información recabada se deberá realizar el análisis de proporción de pacientes con persistencia de parasitemia el día 3, incluyendo las perdidas en el seguimiento, lo que serviría como un indicador indirecto de la eficacia del medicamento evaluado.

Anexo I: Lista de materiales e insumos de campo necesarios para un estudio *in vivo* de 60 pacientes

Ítem	Descripción	Cantidad	Observaciones
1	Aceite de inmersión, tipo A (botella de 100ml)	1	
2	Agua destilada (frasco de 1 L)	1	Para las coloraciones
3	Agujas para tubo <i>vacutainer</i> (caja de 100) 21 x 1 ½ y 20 x ½	2	
4	Alcohol – etanol (frasco de 1 L)	2	
5	Algodón (paquete de 500 g)	1	
6	Baja lenguas de madera (caja de 500)	1	
7	Bolsas para desecho descartables (paquete de 100 (bioseguridad))	1	
8	Caja porta láminas de acrílico o madera	10	
9	Campos descartables x unidad		
10	Capuchón para tubos vacutainer	1	
11	Contador manual	2	
12	Contenedor de bioseguridad	1	
13	Fólder de cartón para transporte de laminas 3x1"	2	
14	Frascos pequeños con tapa para medicamentos	3	
15	Cronómetro de triple entrada	1	
16	Giemsa colorante (frasco de 100 mL)	1	
17	Guantes de látex descartable (caja de 100 unidades) tallas S y M	4	
18	Hojas papel lente (una caja)	60	
19	Láminas portaobjetos con borde pavonado (caja de 50)	35	
20	Lancetas descartables (caja de 100)	5	
21	Lápiz carbón	2	
22	Libretas de apunte	1	
23	Marcador de tinta indeleble	2	
24	Metanol (frasco de 50 mL)	1	Para fijar el frotis
25	<i>Estuche de cartón corrugado para enviar láminas Microslide Mailer</i>	5	
26	Papel toalla (rollos) Papel higiénico (rollos)	5 10	Para absorber aceite de inmersión de las laminas
27	<i>Kit</i> para pruebas de embarazo	40	Si se tomará prueba de embarazo
28	Pipetas de plástico no estériles	120	
29	<i>Rack</i> para secado de láminas	1	
30	Termómetro digital (electrónico)	2	
31	Tubos al vacío con EDTA de 2mL, <i>microtainers</i>	70	Para dosaje de metabolitos de MQ se usa sangre total, papel filtro Whatman 3 para CQ y SP
32	Vasitos descartables para recolectar orina	250	Si se tomara muestra de orina
33	Vasitos descartables para tomar agua	200	
34	Tubos de plástico graduados	50	

Ítem	Descripción	Cantidad	Observaciones
35	Carpeta con tres anillos tamaño A4 o carta	2	
36	Fólder tipo acordeón	1	
37	Cuaderno tamaño carta cuadriculado de 100 hojas	3	
38	Calculadora simple	1	
39	Lapiceros color negro y rojo	6	
40	Estetoscopio	1	
41	Tensiómetro	1	
42	Plumón indeleble de punta fina	3	
43	Tarjador para lápices	2	
44	Engrapador/grapadora	1	
45	Caja de grapas	1	
46	Cinta adhesiva transparente	1	
47	Tijeras	1	
48	Reloj de mesa con alarma	1	
49	Linternas y pilas	2	
50	Tablero de madera con sujetador A4	3	
51	Regla de madera con borde metálico	1	
52	Protector plástico de documentos	12	
53	Hemocue y 100 cubetas para Hemocue	1	Opcional si se piensa dosar hemoglobina
54	Tampón con tinta para huellas digitales	1	
55	Balanza de baño	1	Si el centro de salud no tiene balanza
56	Bolsas de plástico 9 x 12"	60	Para PCR
57	Sobrecitos con <i>silica-gel</i>	300	Para PCR
58	Piezas de papel de filtro WHATMAN, grado 3, cromatográfico.	60	
60	Sobres de manila 9x12"	300	Para PCR
62	Fraccionador de tabletas	1	
63	Bolsas de plástico con cierre zip para guardar el papel filto	70	
	UNIDADES MÓVILES		
	Generador de luz	1	
	Microscopios binoculares portátiles	1	
	Extensiones y regletas	2	
	Maletas o cajas para embalar los insumos	4	
	Cuerda y plásticos para cubrir las cajas en canoas y caballos	5mts	
	Mosquiteros impregnados de larga duración (LLIN) para cada miembro del equipo de investigación	6-10	

Anexo II: Formato para resumir resultados de gota gruesa

Código del paciente	Día de seguimiento	Primera lectura			Segunda lectura			Tercera lectura			Promedio
		Especie	Asexual	Parásitos/ μ L	Especie	Asexual	Parásitos/ μ L	Especie	Asexual	Parásitos/ μ L	Parásitos/ μ L

Anexo III: Contexto epidemiológico

Alta transmisión: Las áreas son hiper endémicas y holo endémicas en las cuales la tasa de prevalencia por paludismo está por encima del 50% durante la mayor parte del año entre niños y niñas de 2 a 9 años de edad. En estas áreas para la etapa final de la infancia o a principios de la niñez prácticamente todos los individuos están infectados.

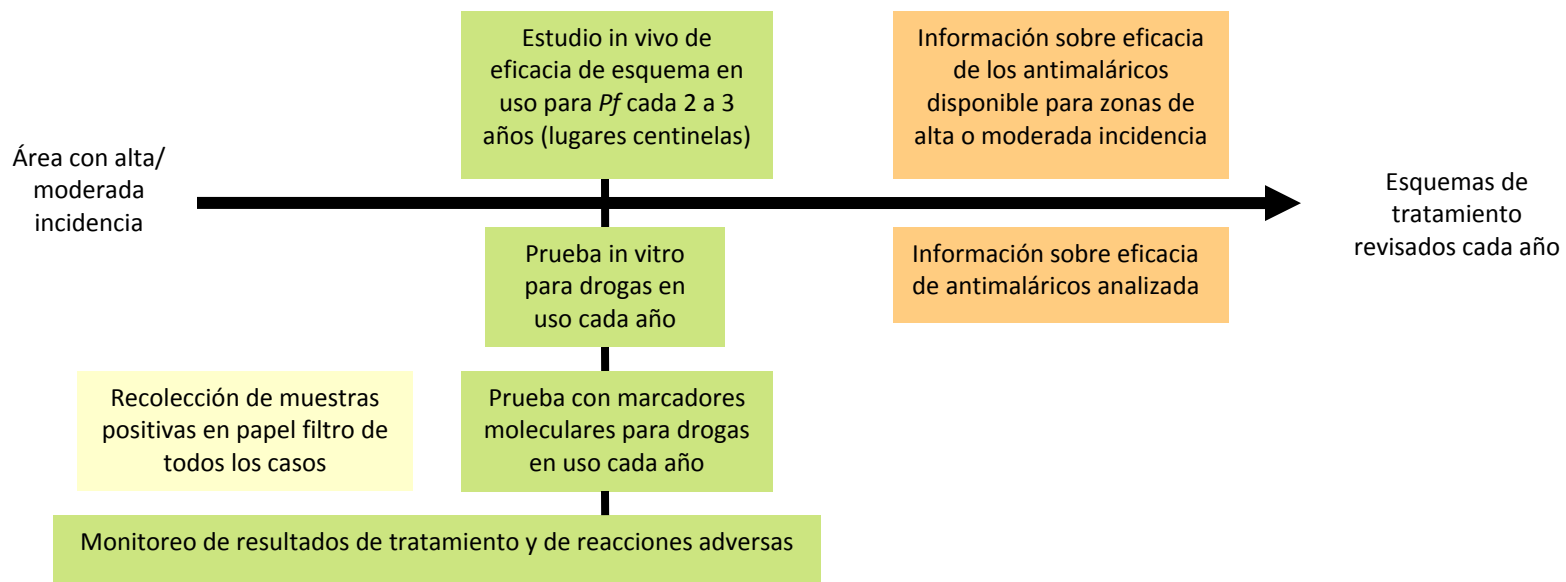
Moderada transmisión: Las áreas son meso endémicas, en las cuales la tasa de prevalencia por paludismo es de 11 a 50% durante la mayor parte del año entre niños y niñas de 2 a 9 años de edad. Aquí la máxima prevalencia de la infección por paludismo se produce en la infancia y la adolescencia, aunque todavía no es inusual alcanzar la edad adulta antes de adquirir una primera infección.

Baja transmisión: Las áreas son hipo endémicas y la tasa de prevalencia por paludismo es de 10% o menos durante la mayor parte del año entre niños y niñas de 2 a 9 años de edad. Aquí la persona puede llegar a la adolescencia antes de adquirir la infección por paludismo o puede escaparse de adquirirla.

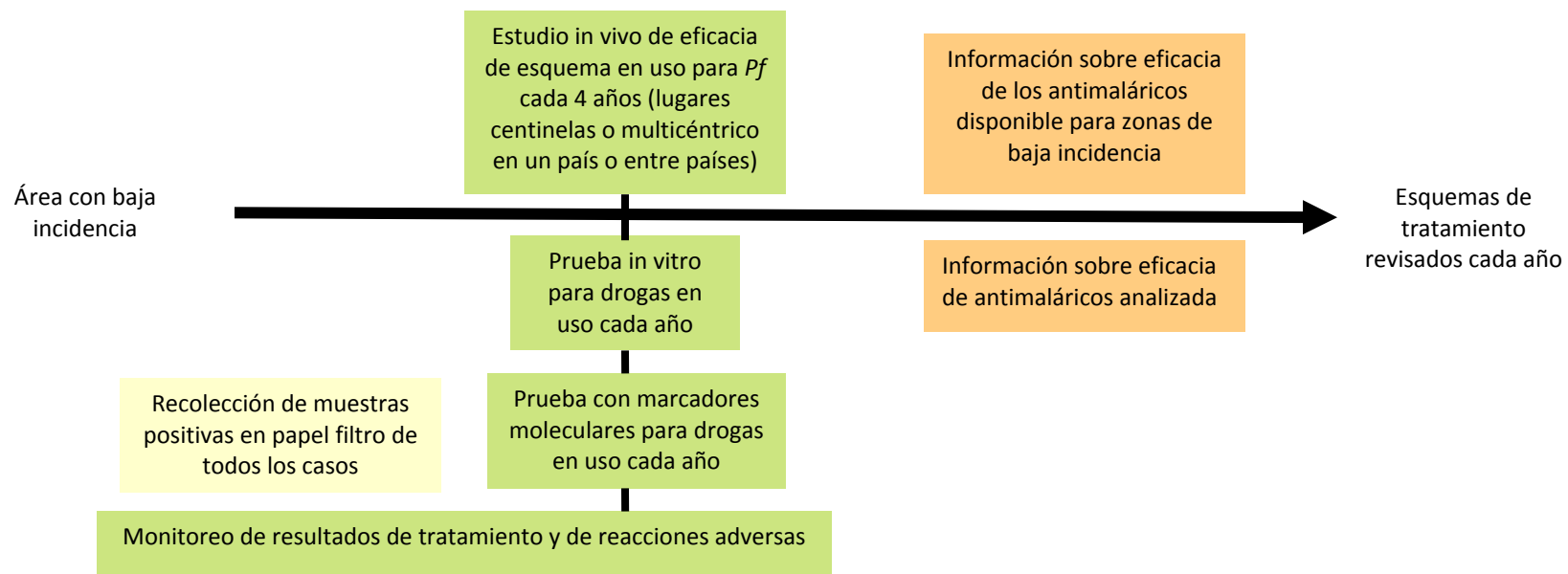
Anexo IV: Tabla resumen

Vigilancia con	Moderada incidencia	Baja incidencia o en descenso (pre-eliminación o eliminación)
In-vivo	Hasta 8 sitios Cada 2-3 años Uno o dos brazos	Un sitio al menos cada 3 años Estudios multicéntricos
Marcadores moleculares	Concomitante con los estudios in-vivo	Todos los casos
In-vitro (ELISA)	Concomitante con los estudios in-vivo	Todos los casos

Anexo V: Flujograma para estudios
De moderada a baja transmisión



De baja a muy baja transmisión



De muy baja transmisión a pre-eliminación o eliminación

