



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Nous tractaments i mètodes diagnòstics de les infeccions de transmissió sexual ulceratives: Sífilis i Mpox

Maria Ubals Cazorla

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



# **Nous tractaments i mètodes diagnòstics de les infeccions de transmissió sexual ulceratives: Sífilis i Mpox**

Memòria de la tesi doctoral presentada per **Maria Ubals Cazorla** per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona.

Dirigida pel Dr. Oriol Mitjà Villar de la Fundació Lluita contra les Infeccions i el Dr. Vicenç García-Patos Briones de la Universitat Autònoma de Barcelona i de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

La persona tutora és Antoni Trilla García de la Universitat de Barcelona i l'Hospital Clínic.

Programa Doctoral en Medicina i Recerca Translacional.

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona.

**Abril 2024**



*“Hacer la cumbre es la guinda del pastel.  
Si hago cumbre, me como la guinda,  
Pero si no la hago, me como el pastel entero.”*

Alpinista Iñaki Ochoa de Olza





## Agraïments

*A la Unitat d'ITS de Can Ruti (Martí, Adrià, Andrea, Tània i Nerea):* gràcies per compartir l'aventura d'iniciar plegats una unitat d'ITS del no res. Gràcies per la passió amb què comentàvem els pacients complexos, per l'entusiasme amb què vam compartir l'epidèmia d'Mpox i per intentar superar-nos cada dia. Sempre ho recordaré amb molt afecte i felicitat.

*A la Unitat de Malalties Infeccioses de Can Ruti:* gràcies per acollir-me com una més del vostre equip, per confiar en mi i fer-me sentir capaç durant els anys que he treballat amb vosaltres.

*A Drassanes (especialment a la Maider), a Checkpoint (especialment a l'Àngel), a Microbiologia de Can Ruti, del 12 de Octubre, de Vall Hebron i de la Universitat de Washington (especialment a la Patricia), a la Clara i la Marlene pels seus coneixements en farmacologia, al Dan per les anàlisis estadístiques, al Gerard pel gran suport que m'ha donat en l'escriptura científica, a la Sònia per la revisió ortogràfica del català, a la CRO (Gemma, Gabriel, Helena i Júlia) i a la CTU (Mel, Lucy, Cristina):* gràcies per ajudar-me a tirar endavant aquest projecte amb tanta constància i esforç al llarg dels últims anys. Sense vosaltres res d'això no hauria estat possible.

*A la Skin NTD Unit (Oriol, Martí, Camila, Andrea, Clara, Gerard, Roser, Miquel Àngel, Sergi, Laia i Cristina):* gràcies per la fortalesa que m'heu ensenyat que cal tenir per treballar en aquest món tan complex de la recerca.

*Al Martí:* gràcies per ser el meu company de viatge en aquesta aventura i per no deixar-me anar mai de la mà, tot i les dificultats que hem trobat al llarg del camí. Gràcies per transmetre'm la teva saviesa, no només la professional, sinó també la de com afrontar la vida. Has estat el REGAL que m'ha brindat aquesta tesi i sé que la nostra amistat durarà per sempre.

*A l'Oriol:* gràcies per donar-me l'oportunitat de conèixer el món de la recerca amb tanta intensitat, coordinant projectes preciosos i animant-me a superar i créixer davant les adversitats.

*Al Vicenç:* gràcies per ensenyar-me a estimar la clínica i a no oblidar-me que aquesta és la meva essència com a dermatòloga. Gràcies per ensenyar-me a explicar contes, per confiar sempre en mi i per donar-me llum quan més ho he necessitat.

*Als meus amics (de la Universitat, d'Igualada, de Ballet, de Mollet, de Vall Hebron i de Teknon):* gràcies per ser-hi sempre. Soc molt afortunada de tenir-vos.

*Al Xavi:* ets el meu amant, amic, company de vida i còmplice infal·lible. Gràcies per construir l'amor amb mi amb tanta intensitat, per ser el meu pilar davant les dificultats i per fer-me veure que junts som invencibles. T'estimo.

*A la família, especialment a la meva mare:* gràcies per ensenyar-me a plantar cara a la vida quan les coses no són com ens agradarien. Gràcies per transmetre'm els teus valors, per mostrar-me que hi ha molt més després del "no puc més" i per ensenyar-me a ser agraïda amb cada detall del nostre entorn, ja que són les petites coses les que fan gran la vida. Gràcies per construir la Maria que soc avui, no ho hauries pogut fer millor.



## **Finançament**

El primer article de la tesi ha comptat amb finançament a través de dues beques competitives: l'*European Research Council* (ERC, *Grant agreement* n° 850450) i la del Fons d'Investigacions Sanitàries (FIS) de l'Institut de Salut Carlos III. El segon i tercer article de la tesi han comptat amb finançament de la Fundació Lluita contra les Infeccions a través del fons "Yomecorono".

El sou de la doctoranda per fer tasques de recerca i assistencials ha estat finançat durant els primers dos anys per la beca Rio Hortega de l'Institut de Salut Carlos III, i durant el tercer any per la Fundació Lluita contra les Infeccions. Durant el quart any, la doctoranda estava contractada a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron per dur a terme tasques assistencials.



# Índex

<b>Agraïments</b> .....	<b>11</b>
<b>Finançament</b> .....	<b>13</b>
<b>Índex</b> .....	<b>15</b>
<b>Abreviatures i acrònims</b> .....	<b>17</b>
<b>Enumeració dels articles de la tesi</b> .....	<b>21</b>
<b>Resum de la tesi</b> .....	<b>23</b>
<b>Introducció</b> .....	<b>27</b>
<i>Infeccions de transmissió sexual ulceratives</i> .....	27
1. <i>Sífilis, infecció per <i>Treponema pallidum pallidum</i></i> .....	29
Introducció .....	29
Situació epidemiològica de la sífilis.....	29
Història natural de la sífilis .....	31
Diagnòstic de la sífilis .....	34
Tractament actual i limitacions .....	37
Readaptació de fàrmacs.....	42
Investigacions prèvies a l'assaig en la readaptació de fàrmacs per tractar la sífilis.....	43
Linezolid.....	46
Justificació de l'estudi .....	50
2. <i>Mpox, infecció pel virus de la verola del mico</i> .....	50
Introducció .....	50
Mecanismes de transmissió descrits abans de l'any 2022.....	51
Brot d'Mpox de l'any 2022 .....	51
Patogènia .....	54
Manifestacions clíniques del brot de l'any 2022.....	55
Estudis moleculars.....	59

Prevençió i control .....	63
Justificació de l'estudi .....	64
<b>Hipòtesis .....</b>	<b>65</b>
<b>Objectius .....</b>	<b>67</b>
<b>Material, mètodes i resultats .....</b>	<b>69</b>
<i>Estudi 1</i> .....	69
<i>Estudi 2</i> .....	97
<i>Estudi 3</i> .....	105
<b>Discussió .....</b>	<b>159</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>171</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>173</b>

## Abreviatures i acrònims

ACA	Assaig Clínic Aleatoritzat
AEMPS	Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris
AUC24	Sigles del nom en anglès d'Àrea Sota la Corba de concentració–temps de 24 hores ( <i>Area Under the Curve during 24 hours</i> )
CD4	Limfòcits T CD4+
CLIA	Immunoassaig de Quimioluminescència
Cmax	Concentració màxima
CMI	Concentració Mínima Inhibitòria
CRO	Sigles del nom en anglès de la Organització Clínica de Recerca ( <i>Clinical Research Organization</i> )
Ct	Sigles del nom en anglès de nombre de Cicles llindar ( <i>Cycle threshold</i> )
CTU	Sigles del nom en anglès de la Unitat d'Assajos Clínics ( <i>Clinical Trial Unit</i> )
CV	Càrrega Viral
DMSO	Dimetil Sulfòxid
ADN	Àcid Desoxiribonucleic
DU	Dosi Única
ERC	Sigles del nom en anglès del Consell Europeu de Recerca ( <i>European Research Council</i> )
EUA	Estats Units d'Amèrica
EIA	Sigles del nom en anglès d'Immunoassaig Enzimàtic ( <i>Enzyme Immunoassay</i> )
EV	Endovenós
fAUC24	Sigles del nom en anglès d'Àrea sota la Corba de Concentració del fàrmac lliure durant 24 hores ( <i>free Area Under the Curve during 24 hours</i> )
FDA	Sigles del nom en anglès de l'Administració d'Aliments i Fàrmacs ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FIS	Fons d'Investigacions Sanitàries

FTA	Sigles del nom en anglès d'Anticossos Treponèmics Fluorescents ( <i>Fluorescent Treponemal Antibody</i> )
H <sub>2</sub> O	Aigua
HUGTP	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
IC	Interval de Confiança
IM	Intramuscular
ISRS	Inhibidors Selectius de la Recaptació de Serotonina
ITS	Infeccions de Transmissió Sexual
ITT	Sigles del nom en anglès d'Intenció de Tractar ( <i>Intention to Treat</i> )
IUSTI	Sigles del nom en anglès de la Unió Internacional de Lluita contra les Infeccions de Transmissió Sexual ( <i>International Union against Sexually Transmitted Infections</i> )
LCR	Líquid Cefalorraquidi
LGBTIQ+	Persones Lesbianes, Gais, Bisexuals, Transsexuals, Intersexuals, Queer i totes les múltiples expressions de la diversitat sexual, d'identitat i d'expressió de gènere (expressat amb el símbol +)
LGV	Limfogranuloma Veneri
MAO	Monoaminoxidasa
MLST	Sigles del nom en anglès de Tipificació Multilocus de Seqüències ( <i>Multilocus Sequence Typing</i> )
Mpox	Infecció pel Virus de la Verola del Mico
MPXV	Virus de la Verola del Mico
MUI	Milions d'Unitats Internacionals
OMS	Organització Mundial de la Salut
OR	Sigles del nom en anglès de Relació de Probabilitats ( <i>Odds Ratio</i> )
PD	Farmacodinàmia
PGB	Penicil·lina G Benzatina
PK	Farmacocinètica
PL	Punció Lumbar
POCT	Sigles del nom en anglès de Test en el lloc de visita ( <i>Point Of Care Test</i> )
PP	Per Protocol
PrEP	Profilaxi Preexposició contra el VIH

qPCR	Sigles del nom en anglès de Reacció en Cadena de la Polimerasa quantitativa ( <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
RDC	República Democràtica del Congo
RIQ	Rang Interquartílic
RNA	Àcid Ribonucleic
RPR	Sigles del nom en anglès de test de Reagina Plasmàtica Ràpida ( <i>Rapid Plasma Reagin</i> )
SEIMC	Societat Espanyola de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica
SIDA	Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida
SNC	Sistema Nerviós Central
TMax	Temps on la concentració del fàrmac és Màxima
T.p.	<i>Treponema pallidum</i>
TPHA	Test d'Hemaglutinació de <i>Treponema pallidum</i>
TPPA	Test d'Aglutinació de Partícules de <i>Treponema pallidum</i>
VDRL	Sigles del nom en anglès de la prova de Laboratori d'Investigació de Malalties Venèries ( <i>Venereal Disease Research Laboratory</i> )
VHS	Virus de l'Herpes Simple
VIH	Virus de la Immunodeficiència Humana
VO	Via Oral
WGS	Sigles del nom en anglès de la Seqüenciació Completa del Genoma ( <i>Whole Genome Sequencing</i> )





## Enumeració dels articles de la tesi

Tesi en format de **compendi de publicacions**.

La tesi consta de 3 objectius i de 3 articles:

- 1 **M. Ubals**, P. Nadal-Baron\*, M. Arando\*, Á. Rivero, A. Mendoza, V. Descalzo- Jorro, D. Ouchi, C. Pérez- Mañá, M. Álvarez, A. Alemany, Y. Hoyos-Mallecot, E. Nunley, N.A.P. Lieberman, A.L. Greninger, C. Galván-Casas, C. Suñer, C. G-Beiras, R. Paredes, Prof. A. Rodríguez-Gascón, A. Canut, Prof. V. García-Patos, Prof. M. Farré, M. Marks, L. Giacani, M. Vall-Mayans\*\* and O. Mitjà\*\*. Oral linezolid compared with benzathine penicillin G for treatment of early syphilis in adults (Trep-AB Study) in Spain: a prospective, open-label, non-inferiority, randomised-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. Apr 2024; 24 (4): 404-416. Epub 8 Jan 2024. **Factor d'Impacte 56,3/ Quartil 1.**
- 2 **M. Ubals\***, EJ. Tarín-Vicente\*, X. Oller, A. Mendoza, A. Alemany, Á. Hernández-Rodríguez, C. Casañ, Á. Rivero, P. Coll, JM. Cabrera, M. Vall, M. Agud-Dios, E. Gil-Cruz, A. Paris de Leon, A. Ramírez-Marinero, MD. Folgueira, MA. Meléndez, V. Buhiiichyk, C. Galván-Casas, R. Paredes, N. Prat, MR. Sala-Farré, JM. Bonet-Simó, PL. Ortiz-Romero, B. Clotet, PJ. Cardona, I. Blanco, M. Marks, C. Suñer\*\* and O. Mitjà\*\*; Movie Group. Evaluating the Accuracy of Self-Collected Swabs for the Diagnosis of Mpox. *Clin Infect Dis*. 3 Apr 2023; 76 (7): 1311-1314. **Factor d'Impacte 11,8/ Quartil 1.**
- 3 C. Suñer\*, **M. Ubals\***, EJ. Tarín-Vicente\*, A. Mendoza, A. Alemany, Á. Hernández-Rodríguez, C. Casañ, V. Descalzo, D. Ouchi, A. Marc, À. Rivero, P. Coll, X. Oller, JM. Cabrera, M. Vall-Mayans, MD. Folgueira, MA. Melendez, M. Agud-Dios, E. Gil-Cruz, A. Paris de Leon, A. Ramírez-Marinero, V. Buhiiichyk, C. Galván-Casas, R. Paredes, N. Prat, MR. Sala-Farre, JM. Bonet-Simó, M. Farré, PL. Ortiz-Romero, B. Clotet, V. García-Patos, J. Casabona, J. Guedj, PJ. Cardona, I. Blanco, M. Marks\*\* and O. Mitjà\*\*; Movie Group. Viral dynamics in patients with monkeypox infection: a prospective cohort study in Spain. *Lancet Infect Dis*. Apr 2023; 23(4):445-453. Epub 12 Dec 2022. **Factor d'Impacte 56,3/ Quartil 1.**



# Resum de la tesi

## **Títol:**

Nous tractaments i mètodes diagnòstics de les infeccions de transmissió sexual ulceratives: Sífilis i Mpox.

## **Introducció:**

Les infeccions de transmissió sexual (ITS) ulceratives, com la sífilis i l'Mpox, són un problema important de salut pública que han experimentat un creixement durant els últims anys. Per fer-hi front calen noves estratègies terapèutiques i diagnòstiques.

Els tractaments per a la sífilis són reduïts; la penicil·lina G benzatina (PGB) intramuscular és la primera elecció, però presenta algunes limitacions: problemes de subministrament, poca penetració al sistema nerviós central (SNC), administració parenteral i falta d'alternatives per a dones embarassades al·lèrgiques. Mitjançant estudis *in vitro* i en el model en conill s'ha demostrat que el linezolid té activitat contra el *Treponema pallidum*. Es tracta d'un antibiòtic amb bona penetració al SNC, que s'administra via oral i seria un candidat prometedor per a ser testat en assajos clínics en humans.

L'Mpox consisteix en una malaltia tropical desatesa causada pel virus de la verola del mico (MPXV), que durant l'epidèmia de 2022 es va estendre fora dels països endèmics i el principal mecanisme de transmissió va ser el contacte directe amb les lesions cutànies, generalment a través de les relacions sexuals. El fet de ser una malaltia desatesa poc estudiada, juntament amb la presentació clínica atípica del brot de 2022, fan necessari estudiar les vies de contagi i el curs de la malaltia.

## **Hipòtesis:**

- 1) L'eficàcia del linezolid oral no és inferior a la PGB intramuscular per aconseguir la curació de la sífilis precoç.
- 2) L'automostreig és una estratègia fiable per a diagnosticar l'Mpox.
- 3) La càrrega viral (CV) del MPXV i el temps fins a l'eliminació del seu ADN són superiors en lesions cutànies comparat amb altres localitzacions corporals.

## **Objectius:**

L'objectiu general és la recerca de noves estratègies terapèutiques i diagnòstiques per a fer front a l'augment de les ITS. Aquest objectiu es pot desglossar en els següents objectius específics:

- 1) Avaluar la no-inferioritat del linezolid oral (600 mg cada 24 hores durant 5 dies) comparat amb la PGB intramuscular (2,4 MUI, dosi única) per aconseguir la curació de la sífilis precoç.
- 2) Avaluar l'exactitud diagnòstica de les mostres autorecollides pels pacients en comparació amb les recollides pels professionals sanitaris per a diagnosticar l'Mpox.
- 3) Avaluar la dinàmica viral del MPXV (CV i temps fins a l'eliminació de l'ADN) en diferents moments de la infecció i diverses localitzacions corporals.

## **Mètodes:**

S'han realitzat 3 estudis:

- 1) Un assaig clínic aleatoritzat, obert, de no-inferioritat, de dues branques de tractament, comparant linezolid amb PGB pel tractament de la sífilis precoç. Es va establir una cohort de pacients amb sífilis primària, secundària o latent precoç atesos a 3 centres d'ITS de Barcelona. Els pacients elegibles es van assignar (1:1) a una de les dues branques de tractament i se'ls va realitzar un seguiment clínic, serològic i molecular durant 48 setmanes. L'objectiu principal era la resposta al tractament, avaluada mitjançant un criteri d'avaluació compost que incloïa la curació clínica, la curació serològica i l'absència de recaiguda. Es mostrava no-inferioritat si el límit inferior de l'interval de confiança del 95 % (IC95%) bilateral per a la diferència de taxes de resposta al tractament era superior al -10 %. L'estudi es va suspendre prematurament per la inutilitat del linezolid durant l'anàlisi intermèdia.
- 2) Un estudi prospectiu observacional de pacients amb Mpox lleu, amb símptomes iniciats els últims 10 dies, atesos a 4 centres d'ITS d'Espanya. A la visita inicial (dia 0), un metge recollia mostres de lesions cutànies i/o d'orofaringe i recte (quan fos necessari), i l'endemà (dia 1) el pacient realitzava l'autopresa de les mateixes mostres, després d'haver estat instruït pel metge. Totes les mostres es van analitzar mitjançant PCR quantitativa (qPCR) per a la detecció d'ADN del MPXV. Es va calcular la concordança global entre la qPCR del dia 0 (referència) i la del dia 1, utilitzant l'estadística kappa.

- 3) Un estudi prospectiu observacional de pacients amb els mateixos criteris d' elegibilitat que l'estudi 2. Es va mesurar la CV del MPXV en mostres de 5 localitzacions corporals (lesions cutànies, faringe, recte, secrecions vaginals/ semen i sang) en 6 moments al llarg de 57 dies. L'objectiu principal era mesurar el temps des de l'inici dels símptomes fins a l'eliminació de l'ADN viral. Les mostres s'analitzaven amb qPCR i un subgrup d'elles mitjançant cultiu viral.

### **Principals resultats:**

- 1) En el moment de la finalització de l'assaig, 59 pacients van ser aleatoritzats: 29 al grup linezolid i 30 al grup PGB. En la població d'anàlisi per protocol, després de 48 setmanes de seguiment, havien respost al tractament 19 de 27 (70,4 %) participants del grup linezolid i 28 de 28 (100 %) del grup PGB (diferència -29,6; IC95% -50,5 a -8,8). Per tant, no es complia el criteri de no-inferioritat establert.
- 2) Es van incloure 50 pacients amb Mpox, amb mostres aparellades de 49, 38 i 10 individus, procedents de lesions cutànies, d'orofaringe i de recte, respectivament. La concordança global entre les mostres de dia 0 i dia 1 va ser del 98 % en lesions cutànies, 79 % en orofaringe i 90 % en recte.
- 3) En total es van recollir 1.663 mostres de 77 pacients. El temps mitjà fins a l'eliminació viral va ser de 25 dies (IC95% 23 a 28) en lesions cutànies, 16 (13 a 19) en orofaringe, 16 (13 a 23) en recte, 13 (9 a 18) en semen i 1 (0 a 5) en sang. La CV mitjana en lesions cutànies va ser de  $7,3 \log_{10}$  còpies/ml a la visita basal, 2 logaritmes superior a la de les altres localitzacions. Els cultius virals van ser positius en mostres amb nivells elevats d'ADN ( $>6,5 \log_{10}$  còpies/ml).

### **Conclusions:**

- L'eficàcia del linezolid a una dosi de 600 mg diaris durant 5 dies no va complir el criteri de no-inferioritat comparat amb la PGB i, per tant, aquest règim no s'ha d'utilitzar per tractar la sífilis precoç.
- L'automostreig és una estratègia fiable per a diagnosticar l'Mpox.
- En pacients amb Mpox lleu, les dades de qPCR suggereixen un període d'aïllament recomanable de 3 a 6 setmanes, però d'acord amb les dades dels cultius virals aquest període es podria reduir.



# Introducció

## Infeccions de transmissió sexual ulceratives

Les infeccions de transmissió sexual (ITS) són un important problema de salut pública a nivell global, no només pel seu impacte immediat sobre la salut sexual i reproductiva de les persones que les pateixen, sinó també per la morbiditat i la mortalitat associades si no es realitza un diagnòstic i un tractament adequats. Les ITS amb manifestacions ulceratives cutànies poden ser causades per diversos patògens i en països de renda mitjana-alta afecten principalment a homes gais i bisexuals que tenen sexe amb homes, i a altres poblacions vulnerables amb conductes sexuals de risc.<sup>1</sup>

Les ITS ulceratives més freqüents són les següents: la sífilis, el limfogranuloma veneri (LGV), l'Mpox, l'herpes genital i el xancroid. A Catalunya, les tres primeres estan sotmeses a vigilància epidemiològica com a malalties de declaració obligatòria; l'herpes genital es monitoritza a través del sistema de notificació microbiològica i la última se sotmetria a vigilància davant de brots epidèmics.

- 1) Sífilis: causada pel bacteri *Treponema pallidum pallidum* (T.p. d'aquí en endavant), amb una prevalença a Espanya de 17,1 casos per 100.000 habitants l'any 2022.<sup>2</sup> La seva progressió es divideix en diferents estadis, segons la durada i l'evolució clínica, i si no es tracta pot acabar afectant diversos òrgans i transmetre's de forma vertical. En pacients infectats pel VIH que no rebien tractament antiretroviral eficaç es van descriure amb més freqüència complicacions neurològiques i manifestacions cutànies més greus associades a la sífilis.<sup>3</sup>
- 2) Limfogranuloma veneri (LGV): causat pel bacteri *Chlamydia trachomatis* serovar L1-L3, que té com a diana el teixit limfàtic. Té una prevalença a Espanya de 2,29 casos per 100.000 habitants l'any 2022.<sup>2</sup> Antigament afectava individus heterosexuels en zones del continent africà i des de l'any 2003 s'ha estès per països d'altres rendes, entre poblacions d'homes que tenen sexe amb homes principalment. Sense tractament, hi hauria una disseminació regional de la infecció, apareixerien adenopaties pèlviques i abdominals doloroses, abscessos i supuració; i l'evolució final seria un estadi fibròtic cicatricial.<sup>4</sup>

- 3) Mpox: causada pel virus de la verola del mico (MPXV) i es tracta d'una ITS zoonòtica emergent després de l'epidèmia viscuda l'any 2022, ja que el virus ha fet una transició a la transmissió de persona a persona i a través del contacte directe amb les lesions cutànies durant l'activitat sexual. A Espanya, s'han registrat un total de 7.647 casos d'Mpox (fins al març de 2024).<sup>5</sup>
- 4) Herpes genital: causat pel virus de l'herpes simple (VHS), majoritàriament pel tipus 2 i menys sovint pel tipus 1, es tracta de la ITS viral més freqüent a escala mundial. A Espanya, s'estima que entre el 10-15 % de la població és portadora de l'herpes genital.<sup>6</sup> Provoca l'aparició de vesícules doloroses a les àrees anogenital, perianal o, més rarament, a la regió oral. Tot i així, individus amb herpes genital poden no tenir símptomes, però transmetre la infecció als seus contactes sexuals, per excreció asimptomàtica del VHS.
- 5) Xancroid: causat pel bacteri *Haemophilus ducreyi*, és una causa molt infreqüent d'úlceres genital als països europeus. Aquesta infecció és endèmica en zones d'Àfrica, Àsia i Amèrica del Sud, però l'augment de fluxos migratoris podria incrementar el nombre de casos en països europeus.<sup>7</sup> Tot i això, no s'han notificat casos a Espanya des de fa molts anys.

Hi ha hagut un creixement exponencial de les ITS a la majoria dels països occidentals durant els últims 20 anys, fent que augmenti la necessitat de nous mètodes de cribratge i de diagnòstic, de noves estratègies de prevenció i de gestió de casos, i de desenvolupament de nous fàrmacs i vacunes per tal de frenar aquest creixement i reduir la morbiditat associada a les ITS.

D'entre les ITS ulceratives esmentades, aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi de la sífilis i de l'Mpox pels motius que s'exposen a continuació. En primer lloc, a causa dels problemes de subministrament de la penicil·lina, amb les conseqüències derivades d'aquest problema en pacients amb sífilis, s'ha creat la necessitat d'investigar noves opcions terapèutiques per a aquesta infecció. En segon lloc, durant al brot d'Mpox de l'any 2022, es va crear la necessitat de fer recerca sobre les mesures de prevenció i control dels casos, per a la millora de la gestió de brots epidèmics d'aquesta segona infecció.



## 1. Sífilis, infecció per *Treponema pallidum pallidum*

### Introducció

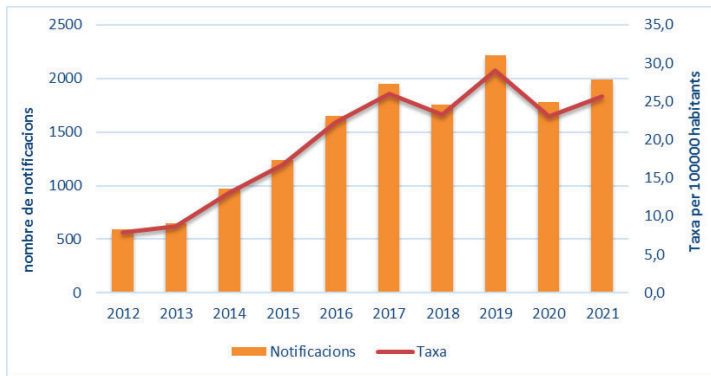
La sífilis és causada pel bacteri T.p. Més del 90 % dels casos nous de sífilis es produeixen als països en desenvolupament, però la sífilis també és una preocupació per a la salut en diversos països desenvolupats, incloent-hi els països europeus,<sup>8</sup> ja que la incidència ha augmentat marcadament des de l'any 2000.<sup>1</sup> La població de major risc en aquests països són els joves, els homes que tenen relacions sexuals amb homes i els treballadors/es sexuals.<sup>9</sup>

La sífilis té conseqüències mèdiques greus quan afecta el sistema nerviós central (SNC), com ara complicacions oculars, auditives i neurològiques. Per altra banda, les persones infectades tenen un major risc d'adquirir i de transmetre el VIH.<sup>10</sup> A més, la sífilis congènita està relacionada amb una alta taxa de mort fetal i mortalitat infantil. Les complicacions durant l'embaràs són 12 vegades més freqüents en les dones amb sífilis que en les dones seronegatives, i es produeixen en el 80 % de les dones amb sífilis activa, incloent-hi mort fetal (20-40 %), mort perinatal (15-20 %) i infecció neonatal greu (20-40 %), amb només un 20 % de possibilitats de donar a llum un nadó no infectat.<sup>11,12</sup>

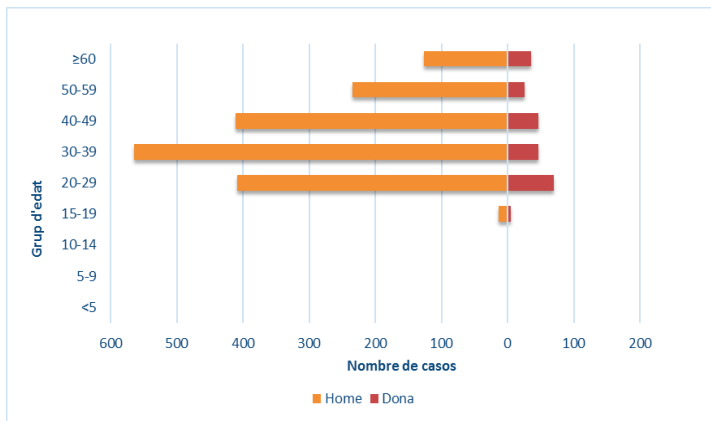
### Situació epidemiològica de la sífilis

La taxa global de sífilis s'ha incrementat un 18,4 % en els últims 10 anys a Catalunya, passant dels 7,9 casos per 100.000 habitants l'any 2012 als 25,7 casos per 100.000 habitants el 2021, amb un total de 1.986 casos notificats al 2021 (**Figura 1**). El 88,5 % dels casos són homes amb una raó home: dona de 8. La taxa en els homes és 7 vegades superior a la de les dones, registrada durant el període 2012-2021. La mitjana d'edat dels casos registrats és de 39 anys, 40 anys per les dones i 39 anys pels homes i un 10,2 % dels casos registrats són menors de 25 anys (**Figura 2**). El 76,7 % dels casos registrats a Catalunya són homes que tenen sexe amb homes, grup més afectat des de l'any 2012 (**Figura 3**).<sup>13</sup>

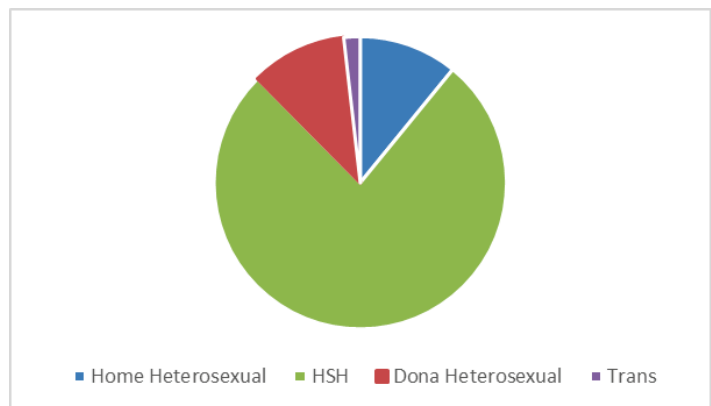
A Espanya la prevalença és de 17,1 casos per 100.000 habitants l'any 2022,<sup>2</sup> amb les mateixes característiques epidemiològiques que les descrites a Catalunya.



**Figura 1.** Evolució de la taxa dels casos notificats de sífilis a Catalunya, 2012-2021.<sup>13</sup>



**Figura 2.** Distribució dels casos de sífilis per grup d'edat i sexe a Catalunya, 2021.<sup>13</sup>



**Figura 3.** Distribució dels casos de sífilis segons el grup de transmissió a Catalunya, 2021.<sup>13</sup>

A Europa, l'any 2021 es van registrar 25.270 casos, també amb una raó home: dona de 9, la majoria dels casos també per sobre els 35 anys i el 75 % dels casos eren en homes que tenen sexe amb homes.<sup>1</sup> La prevalença mundial de sífilis l'any 2020 va ser del 0,6 % (0,5-0,7 %).<sup>1</sup>

## Història natural de la sífilis

La sífilis és una infecció sistèmica crònica que progressa a través de diferents estadis actius i latents.

El T.p. penetra a través de les mucoses o a partir de petites erosions o solucions de contigüitat cutànies. En el lloc de penetració del T.p. es desenvolupa el xancre, al cap de 3-4 setmanes després del contagi, que es tracta de la principal manifestació de la sífilis primària. El xancre inicialment és una pàpula, que es necrosa i esdevé una úlcera superficial, amb vores lleument sobrelevades i indurades, amb una superfície llisa i brillant, amb secreció serosa, típicament no dolorosa i que associa una adenopatia regional que sol ser indolora (**Figura 4A**). El xancre sol ser únic, però a vegades pot ser múltiple, especialment en pacients amb VIH o immunodeprimits.<sup>14</sup> El més habitual és que el xancre es localitzi a la zona genital, però també pot aparèixer a l'àrea perianal o perioral, zones també molt implicades en les relacions sexuals; però cal tenir en compte, que tot i que és poc habitual, el xancre pot aparèixer en qualsevol localització corporal, suposant reptes diagnòstics per als clínics quan apareix en localitzacions extragenitals.<sup>15</sup> En el xancre hi ha una gran quantitat de T.p. i, per tant, es tracta d'una lesió molt contagiosa. Una manifestació poc freqüent de la sífilis primària és la balanitis de Follmann (**Figura 4B**), que es pot manifestar des d'una balanitis erosiva superficial fins a una balanopostitis més inflamatòria, també acompanyada d'adenopaties regionals.<sup>16</sup> Sense tractament, en 2-3 setmanes el xancre i la balanitis de Follmann curarien espontàniament.<sup>17,18</sup>

La infecció per T.p. s'estén ràpidament pel sistema limfàtic i hematològic i esdevé sistèmica, manifestant-se la fase secundària de la infecció, 1-2 mesos després de l'aparició del xancre. La manifestació més típica de la sífilis secundària és l'exantema maculopapular (**Figura 4D**), que pot afectar el tronc i les extremitats, i que típicament afecta les palmes i les plantes. Es poden observar plaques anulars en palmells i plantes, que presenten una descamació perifèrica anular anomenada "Collaret de Biètt" i que reben el nom de claus palmoplantars o sifilides (**Figura 4C**).<sup>19</sup> Existeixen formes de sífilis malignes en què l'exantema pot ser nodular, ulceratiu o pustulós, on les lesions poden simular xancre primaris disseminats, que apareixen en individus immunodeprimits. Amb menys freqüència es pot observar l'alopecia arnada (**Figura 4F**), que pot afectar el cuir cabellut, les celles o la barba, amb una zona de seborrea en la línia d'implantació del cuir cabellut que rep el nom de "*corona veneris*", i és reversible amb el tractament.<sup>19</sup> Les lesions cutànies de la sífilis secundària, fora de les mucoses, tenen poca

quantitat de T.p. i la capacitat de transmissió és molt baixa a través del contacte amb la pell intacte. En la sífilis secundària, les manifestacions orals poden ocórrer fins a un terç dels pacients i poden ser altament específiques, com és el cas de les plaques mucoses linguals (**Figura 4E**). Es tracta de plaques ovalades, depapilades i lleument sobreelevades en la superfície de la llengua, que poden ulcerar-se i anar acompanyades de faringitis, laringitis i adenopaties cervicals. A més, en diverses sèries de pacients amb sífilis secundària on estudien quin tipus de lesions orals presenten els pacients, s'observa que entre un 30-70 % dels casos descriuen úlceres o erosions inespecífiques o inclús úlceres de tipus leucoplàsia.<sup>20</sup> En les lesions orals podem trobar gran quantitat de T.p. i són altament contagioses. Els condilomes plans es manifesten en el 6-23 % dels casos de sífilis secundària, poden ser dolorosos, són molt contagiosos i típicament apareixen en la regió genital, perianal i àrees intertriginoses. La sífilis secundària pot anar associada a clínica sistèmica en forma de malestar general, astènia, cefalea, pèrdua de pes, adenopaties generalitzades, odinofàgia, febre, etc. També pot haver-hi afectació de qualsevol òrgan, i per això a la sífilis se l'anomena "la gran simuladora", podent presentar-se també en forma d'hepatitis, glomerulonefritis, úlceres digestives, periostitis o artritis. Sense tractament, la sífilis secundària es resoldria al llarg de 3-12 setmanes i podria presentar reactivacions durant els primers 2 anys de la infecció, episodis en els quals el pacient podria contagiar altres persones.<sup>17,18</sup>

El T.p. té especial tropisme també pel SNC i el pot afectar de manera precoç al llarg de tot el curs de la infecció, de forma asimptomàtica o simptomàtica. L'afectació neurològica precoç més típica és la meningitis. L'afectació ocular en forma d'uveïtis o neuritis òptica (encara que pot haver-hi afectació de qualsevol part de l'ull) i l'afectació auditiva en forma d'hipoacúsia, també poden aparèixer en qualsevol moment, i es tracten com una neurosífilis.<sup>17,18</sup>

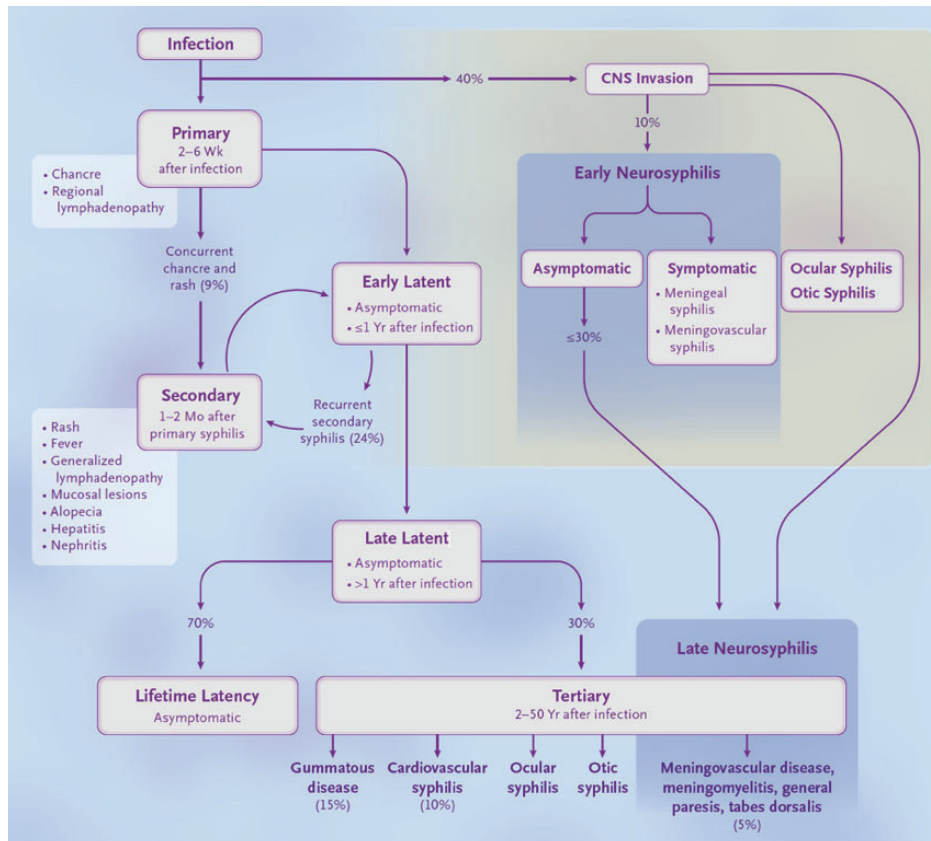
La sífilis latent és aquella etapa compresa entre el moment de la curació de les lesions de la sífilis secundària i l'aparició de les possibles manifestacions tardanes (sífilis terciària), on el pacient presenta serologies positives, però absència de clínica, i pot durar anys (**Figura 5**). Les guies europees de la Unió Internacional de Lluita contra les Infeccions de Transmissió Sexual (IUSTI) utilitzen una durada d'un any com a punt de tall per a classificar la sífilis latent en precoç o tardana. La infecciositat pot ocórrer de manera intermitent a causa de la presència de T.p. en el torrent sanguini, la majoria de les recaigudes es produeixen durant el primer any i, com més tardana és la sífilis latent, menys infeccions és el pacient.<sup>17,18,21</sup>



**Figura 4.** Imatges clíniques de sífilis primària i secundària, que provenen de pacients que s'han visitat en la unitat d'ITS on treballava la doctoranda durant el desenvolupament d'aquesta tesi. **A:** xancres sifilític en gland i **B:** balanitis de Follmann, en pacients amb sífilis primària. **C:** claus sifilític amb afectació plantar, **D:** exantema maculopapular a tronc, **E:** plaques mucoses linguals i **F:** alopecia arnada, en pacients amb sífilis secundària. Es disposa del permís per a la publicació d'aquestes imatges.

La sífilis terciària o tardana és pràcticament anecdòtica de trobar actualment, es desenvolupa mesos-anys després de la infecció per T.p. Es manifesta a nivell cutani en forma de gomes, que són nòduls o plaques ulceratives, sovint amb morfologia arciforme, que poden créixer i causar úlceres que curen mitjançant cicatrius desfigurants, podent arribar a causar destrucció mucosa i òssia. Típicament afecten el paladar, la llengua i els llavis, però poden aparèixer en qualsevol localització cutània i també en qualsevol altre òrgan, amb gran predilecció també pels ossos. En la sífilis terciària també és habitual l'afectació del SNC en forma d'afectació vascular

(hemiplègia, afàsia, convulsions, meningiomielitis) o afectació parenquimatosa (demència o tabes dorsal). L'afectació cardiovascular en forma d'aneurismes aòrtics (sobretot a l'aorta ascendent), insuficiència aòrtica, estenosis de les artèries coronàries i miocarditis, també és típica d'aquest estadi tardà de la infecció.<sup>17,18</sup>



**Figura 5.** Història natural de la sífilis no tractada.<sup>17</sup>

### Diagnòstic de la sífilis

El diagnòstic de la sífilis es basa en la detecció directa de T.p. amb microscòpia o del seu ADN mitjançant tècniques diagnòstiques moleculars, i de proves serològiques que avaluen la resposta d'anticossos contra certs antigens treponèmics o d'altres. El diagnòstic dels diferents estadis de sífilis depèn de la interpretació de les proves de laboratori, conjuntament amb la presentació clínica del pacient.<sup>19,21</sup>

### *Mètodes indirectes*

Actualment, hi ha dues proves serològiques que ens permeten diagnosticar la sífilis: les proves treponèmiques i les no-treponèmiques, que solen tardar entre 10-15 dies a positivitzar.

Les proves treponèmiques (és a dir, TPHA, TPPA, CLIA, FTA, EIA) detecten un anticòs contra un antigen treponèmic. Són molt sensibles i específiques, tot i que no es poden diferenciar dels anticossos produïts per infeccions causades per altres treponematosi (com la pinta, el bejel o el pian). Generalment es mantenen positius de forma indefinida i, només en aquells casos en què la sífilis es tracta molt precoçment, poden esdevenir negatius. S'utilitzen com a despistatge i confirmació dels casos. Existeixen proves ràpides per realitzar a consulta que detecten aquests anticossos en pocs minuts, a través de tècniques d'immunocromatografia.<sup>19,21,22</sup>

Les proves no-treponèmiques o reagíniques (és a dir, RPR i VDRL) detecten un anticòs contra un antigen no-treponèmic, és a dir, contra la cardiolipina, la lecitina i el colesterol, components de les cèl·lules que són modificats pels T.p. quan les infecta i dona lloc al desenvolupament d'anticossos contra aquests components. Aquests són molt sensibles i poc específics, ja que poden ser positius en altres condicions com: altres infeccions, malalties autoimmunes, l'embaràs o després d'algunes vacunes. Es tracta d'una prova molt antiga, universal i de baix cost. La quantitat d'aquests anticossos es correlaciona amb l'activitat de la infecció i s'utilitza per controlar la resposta al tractament. Tot i que es considera que no hi ha criteris definitius de curació per a la sífilis, l'avaluació clínica i serològica 3, 6 i 12 mesos després del tractament ens permet realitzar-ho. Es considera curació serològica si es dona una seroconversió de l'estat d'anticossos no-treponèmics o una disminució de dues dilucions dels títols d'anticossos en comparació amb els títols basals. Si això no ocorre, o bé persisteixen signes o símptomes clínics d'infecció, es considera fracàs del tractament.<sup>19,21,22</sup>

### *Mètodes directes*

El T.p. té un especial tropisme per la pell i les mucoses, sobretot en les fases primària i secundària de la infecció, i això permet obtenir mostres amb facilitat de les lesions mucoses o ulcerades per detectar el microorganisme i així realitzar el diagnòstic de la infecció.

El microscopi de camp fosc permet realitzar el diagnòstic de la sífilis mitjançant la detecció visual de les espiroquetes en moviment de les lesions cutànies. La identificació és senzilla per

a un microbiòleg expert gràcies als típics moviments episòdics de la gran quantitat de T.p. que hi ha als xancres. Degut a la presència d'espироquetes sapròfites a la cavitat oral i anal, el camp fosc no és útil per a xancres en aquestes localitzacions, ja que comportarien resultats falsos positius.<sup>19,21</sup>

Els estudis moleculars tenen per diana el gen que codifica per la lipoproteïna de membrana del T.p. de 47Kda (TpN47, gen *tp0574*). Permeten realitzar un diagnòstic més acurat, especialment en casos amb sífilis primària abans que les proves serològiques hagin positivitzat o en xancres en localitzacions on no és possible realitzar el camp fosc.

Recentment, s'ha aconseguit la detecció del T.p. en mostres de saliva, de mucosa oral i anal en casos de sífilis precoç que no presentaven úlceres en aquestes localitzacions, reconeixent-se l'existència d'una excreció de T.p. asimptomàtica, sent significativament més freqüent en la sífilis secundària, ja que la càrrega bacteriana circulant és més alta en aquest estadi de la infecció.<sup>23</sup> També s'ha aconseguit detectar el T.p. en mostres en plasma, orina i semen.<sup>24,25</sup> En un estudi es va aconseguir detectar el T.p. en un 91 % (49/54) de pacients amb sífilis primària, en un 74 % (69/93) de sífilis secundària i en un 8 % (4/53) de sífilis latent precoç.<sup>24</sup>

Els mètodes moleculars d'estudi de l'ADN del T.p. permeten, a més, conèixer la soca patògena d'un pacient i permeten aclarir si els episodis repetits de sífilis són deguts a una reinfecció (soca patògena genotípicament diferent de la que va causar la infecció anterior) o bé a una recaiguda (soca patògena genotípicament igual que la de l'episodi inicial). Detectar una recaiguda és clínicament rellevant, ja que pot indicar que s'ha produït un fracàs en el tractament.

Les tècniques de seqüenciació utilitzades actualment disponibles poden ser: la seqüenciació del genoma complet (WGS, de l'anglès *Whole Genome Sequence*) i la tipificació multilocus de seqüències (MLST, de l'anglès *Multilocus Sequence Typing*) del T.p. a partir de mostres clíniques. Mentre que la MLST seqüencia fragments del genoma del T.p., la WGS realitza la seqüenciació completa del genoma de la soca patògena del T.p. La WGS té un poder discriminatori més alt, però el principal inconvenient és que requereix una elevada càrrega bacteriana, que no és habitual trobar en la sífilis. Tanmateix, la MLST és assequible per a molts laboratoris clínics i complementa els estudis genòmics quan la WGS no es pot dur a terme, ja que no requereix tanta càrrega bacteriana.<sup>26,27</sup>



## Tractament actual i limitacions

Les opcions terapèutiques per a la sífilis es limiten, de forma general, a un antibiòtic: la penicil·lina G benzatina (PGB) intramuscular (IM).<sup>21</sup> Malgrat la seva alta eficàcia, la penicil·lina té limitacions per les següents raons:

1. No travessa eficaçment la barrera hematoencefàlica, ja que el quocient líquid cefalorraquidi (LCR) – sèrum de la penicil·lina en absència d'inflamació meníngia és inferior a 0,15 (15 %).

El T.p. envaeix el SNC en el 40 % dels pacients, generalment sense símptomes.<sup>28-30</sup> Les implicacions pronòstiques de la invasió del SNC són la possibilitat de complicacions neurològiques greus i el fracàs del tractament a causa dels bacteris segrestats al SNC, que poden ocasionar una recaiguda i un risc de progressió de la malaltia a les seves etapes tardanes i més greus.<sup>29</sup>

L'única forma de diagnosticar la neurosífilis és mitjançant una punció lumbar per examinar el LCR, procediment invasiu no absent de riscos. Les recomanacions actuals de la IUSTI indiquen la punció lumbar en pacients neurològicament simptomàtics i en pacients asimptomàtics amb fracàs del tractament (incloent-hi l'augment dels títols o bé la manca de disminució dels títols de les serologies no-treponèmiques).

El tractament de la sífilis amb afectació neurològica, auricular o ocular és la penicil·lina aquosa cristal·lina endovenosa (EV) cada 4 hores o bé penicil·lina procaïna IM cada 24 hores amb probenecid cada 6 hores durant 10-14 dies, pauta que pot ser estressant per als pacients, provoca un augment de la necessitat d'hospitalitzacions i dels costos secundaris a aquestes, i pot donar lloc a una falta d'adherència al tractament en alguns entorns, especialment als països de rendes baixes.

2. Els problemes de producció i subministrament globals en diferents països han donat lloc a un augment dels casos de sífilis congènita, estimats en més de mig milió de casos.<sup>31-</sup>

33

3. L'administració parenteral necessita ajuda especialitzada per a la injecció i una esterilització adequada. Aquest fet requereix una infraestructura sanitària que no sempre

està disponible, per exemple en zones rurals de països pobres. A més, les complicacions locals fruit de la via intramuscular (com el dolor i la inflamació en el lloc d'injecció) comparativament no es donen per via oral.

4. L'elevada prevalença d'al·lèrgia a la penicil·lina, referida per un 10 % de la població a escala global.<sup>34</sup>
5. El potencial de les soques per adquirir resistència a la penicil·lina ha estat reconegut en el passat,<sup>35</sup> ja que el genoma del T.p. codifica per una proteïna amb activitat  $\beta$ -lactamasa. Es tracta de la lipoproteïna TpN47, però s'inhibeix per la penicil·lina hidrolitzada i fins a l'actualitat mai s'hi ha reportat resistència.
6. Existeixen pocs tractaments de segona línia (cefalosporines, macròlids i tetraciclins), però requereixen múltiples dosis de tractament i algun d'ells ja ha desenvolupat resistències (64-100 % de resistència a l'azitromicina).<sup>36</sup>

S'han avaluat pocs antibiòtics en assaigs clínics aleatoritzats (ACA) per al tractament de la sífilis precoç (**Taula 1**). Hi ha dos ACA que comparen la penicil·lina amb l'azitromicina,<sup>37,38</sup> però ja no es recomana per l'aparició de resistències.<sup>36,39,40</sup> La ceftriaxona ha demostrat eficàcia, però requereix pautes IM o EV diàriament durant 10-14 dies,<sup>41</sup> i no hi ha evidència robusta per al seu ús en la neurosífilis.<sup>42</sup> També s'han realitzat dos estudis pilot considerant l'eficàcia de la cefixima<sup>43,44</sup> i l'amoxicil·lina oral (amb probenecid o sense)<sup>45</sup> amb resultats positius, però es requereixen estudis de fase III per confirmar l'eficàcia d'aquests fàrmacs. L'eficàcia de la doxiciclina té suport en dades de dos estudis prospectius i petits estudis retrospectius observacionals<sup>46,47</sup> que analitzen les taxes de resposta serològica, essent molt limitada l'evidència del seu ús en la neurosífilis.<sup>48</sup>

Per tot plegat cal realitzar estudis rigorosos comparant la penicil·lina amb altres agents antibacterians per avaluar-ne la dosi, la durada del tractament i la formulació d'un antibiòtic que pugui aconseguir la curació de la sífilis amb una toxicitat i cost mínims. Un antibiòtic amb una millor penetració al SNC seria potencialment més eficaç que la PGB per tractar les espiroquetes segrestades al SNC i tindria millors resultats clínics, serològics i funcionals en pacients amb neuroinvasió.

**Taula 1.** Selecció dels principals estudis sobre tractaments alternatius de la sífilis precoç, 2005-2023.

Referència estudi	Fàrmac (dosi)	Estudi (localització)	Tomany mostral (aleatorització)	Població	Control (dosi)	Resultats
Riedner et al. 2005 <sup>38</sup>	Azitromicina (2 g, VO, DU)	ACA Fase III multicèntric (Tanzània)	328 (1:1)	Sífilis primària i latent precoç	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació clínica (2 setmanes) i/o serològica (9 mesos) 97,7 % Azitromicina (IC95% 94,0 a 99,4) vs. 95 % PGB (IC95% 90,6 a 97,8). Equivalència IC95% -1,7 a 7,1.
Hook et al. 2010 <sup>49</sup>	Azitromicina (2 g, VO, DU)	ACA Fase III multicèntric (EUA, Madagascar)	517 (1:1)	Sífilis precoç (test VIH negatiu)	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació serològica (6 mesos) 180 (77,6 %) Azitromicina vs. 186 (78,5 %) PGB (IC95% 1 banda 7,2).
Cao et al. 2017 <sup>50</sup>	Ceftriaxona (1 g/24h, EV, 10 dies)	ACA Fase III multicèntric (Xina)	301 ITT 230 PP (1:1)	Sífilis precoç (test VIH negatiu)	PGB (2,4 MUI/setmana, IM, 2 setmanes)	Curació serològica (6 mesos) 90,2 % Ceftriaxona vs. 78 % PGB (p= 0,01). Curació serològica (12 mesos) 92,0 % Ceftriaxona vs. 81,4 % PGB (p= 0,02).
Stafylis et al. 2021 <sup>43</sup>	Cefixima (400 mg/12h, VO, 10 dies)	ACA Estudi Pilot multicèntric (EUA)	58 ITT 30 PP (1:1)	Sífilis precoç	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació serològica (3 o 6 mesos) 93 % PGB (IC95% 81 a 100; 14/15) vs 87 % Cefixima (IC95% 69 a 100; 13/15).

Ando et al. 2023 <sup>45</sup>	Amoxicil·lina + Probenecid (3000 mg)	ACA Estudi Pilot (Londres)	112 (1:1)	Sífilis en pacients amb VIH	Amoxicil·lina (1500 mg)	Curació serològica (12 mesos) 93,5 % Amoxicil·lina vs. 97,9 % Amoxicil·lina+ Probenecid.
Ikeuchi et al. 2021 <sup>51</sup>	Amoxicil·lina (1,5 g/dia, 4- 14 setmanes)	Observacional retrospectiu (Japó)	138	Sífilis precoç i tardana	-	Curació serològica (12 i 24 mesos, precoç/tardana) 131/138 i 138/138, 95 % (IC95% 89,8 a 97,9).
Tanizaki et al. 2015 <sup>52</sup>	Amoxicil·lina (3g/dia) + Probenecid (0,75- 1,5 g/dia, 2 (precoç)- 4 (tardana) setmanes)	Observacional retrospectiu (Japó)	286	Sífilis precoç i tardana en pacients amb VIH	-	Curació serològica (24 mesos) 273/286 95,5 % (IC95% 92,4 a 97,7). Un total de 21/286 7,3 % canvien tractament per efectes adversos.
Tsai et al. 2014 <sup>47</sup>	Doxiciclina (100 mg/12h, VO, 14 dies)	Observacional retrospectiu multicèntric (Taiwan)	123 Doxiciclina 6 mesos (91 per 12 mesos), 271 PGB 12 mesos	Sífilis precoç i en pacients amb VIH	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació serològica (6 mesos) 63,4 % Doxiciclina vs. 72,3 % PGB (p= 0,075). Curació serològica (12 mesos) 65,9 % Doxiciclina vs. 68,3 % PGB (p= 0,681).
Dai et al. 2017 <sup>53</sup>	Doxiciclina (100 mg/12h, VO, 14 dies precoç i 28 dies tardana)	Observacional retrospectiu (Xina)	118	Sífilis precoç i tardana	-	Curació serològica (12 mesos) 95,8 % (90/94) precoç i 79,2 % (19/24) tardana.
Antonio et al. 2019 <sup>46</sup>	Doxiciclina (100 mg/12h, VO, 14 dies precoç i 28 dies tardana)	Observacional retrospectiu (Brasil)	50 Doxiciclina, 115 PGB	Sífilis precoç i tardana en pacients amb VIH	PGB (2,4 MUI, IM, DU precoç i 3 dosis tardana)	Curació serològica (6-12 mesos) 72 % Doxiciclina (IC95% 58 a 84) vs. 70 % PGB (IC95% 60 a 78) (p = 0,753).

Estudis registrats en marxa [revisats fins al gener de 2024]							
Referència estudi	Fàrmac (dosi)	Estudi (localització)	Tomany mostral (aleatorització)	Població	Control (dosi)	Avaluació	Publicat
ClinicalTrials.gov ID NCT03752112	Cefixima (400 mg/12h, VO, 10 dies)	ACA Fase II multicèntric (Brasil)	120 Cefixima, 60 PGB	Sífilis precoç en dones no embarassades	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació serològica (6 mesos)	Protocol
ClinicalTrials.gov ID NCT04958122	Cefixima (400 mg/12h, VO, 10 dies)	ACA Fase III multicèntric (USA i Perú)	400 (1:1)	Sífilis precoç	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació serològica (9 mesos)	Estudi pilot
ClinicalTrials.gov ID NCT05548426	Linezolid (600 mg/12h, VO, 5 i 10 dies)	ACA Estudi pilot (Perú)	60 (1:1:1)	Sífilis precoç	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació serològica (6 mesos)	No
ClinicalTrials.gov ID NCT05069974	Linezolid (600 mg/12h, VO, 10 dies)	ACA Fase III multicèntric (Espanya)	224 (1:1)	Sífilis precoç	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació clínica (2 i 6 setmanes), serològica (12 mesos) i molecular	Primera part com a estudi pilot
ClinicalTrials.gov ID NCT04838717	Doxiciclina (100 mg/12h, VO, 14 dies)	ACA Fase III (França)	200 (1:1)	Sífilis precoç	PGB (2,4 MUI, IM, DU)	Curació serològica (6 mesos)	No

**Llegenda Taula 1.** VO: Via Oral; DU: Dosi Única; ACA: Assaig Clínic Aleatoritzat; EUA: Estats Units d'Amèrica; MUI: Milions d'Unitats Internacionals; IC: Interval de Confiança; VIH: Virus de la Immunodeficiència Humana; EV: Endovenós.

## Readaptació de fàrmacs

La readaptació de fàrmacs consisteix en la investigació de fàrmacs existents, segurs i comercialitzats per a una indicació terapèutica nova. La readaptació de fàrmacs és una estratègia universal per a malalties a les quals es destinen pocs recursos perquè d'aquesta manera es redueix el temps i els costos per tal que el medicament arribi al mercat.

Tradicionalment, el descobriment de noves teràpies antibacterianes s'havia centrat en trobar nous fàrmacs amb nous objectius i noves dianes terapèutiques. No obstant això, aquesta estratègia resultaria extremadament cara i requeriria molt de temps. Tot i que en el cas de la sífilis, la indústria farmacèutica buscava de manera agressiva nous fàrmacs antisifilítics en cas d'una epidèmia per una soca resistent, de moment no hi ha una pressió per fer-ho abans que això pugui ocórrer. En aquest context, les estratègies de readaptació de fàrmacs per a la sífilis, és a dir, buscar noves aplicacions per als fàrmacs existents, poden reduir el cost del desenvolupament de nous tractaments i són necessàries per raons humanitàries. La riquesa de dades farmacològiques disponibles actualment, el coneixement dels mecanismes d'acció dels antimicrobians, juntament amb els mètodes desenvolupats recentment per a realitzar proves de susceptibilitat de fàrmacs per al T.p., obre la porta a la readaptació de fàrmacs i a nous assaigs clínics en humans amb sífilis.

Les espiroquetes són filogenèticament diferents dels bacteris gram-positius i gram-negatius, i la seva susceptibilitat a diversos antimicrobians no s'ha caracteritzat bé perquè el microorganisme no es podia cultivar *in vitro* fins fa molt poc. El 2018, Edmonson et al.<sup>54</sup> va descriure un sistema de cultiu tissular *in vitro* basat en el cocultiu del T.p. i cèl·lules epitelials Sfl de conill (SflEp) que podien suportar el creixement del T.p. fora d'un hoste susceptible. Aquest mètode ha permès facilitar l'estudi d'antimicrobians ja aprovats o experimentals contra el T.p., ja que com s'ha dit abans les taxes de creixement global elevades de sífilis requereixen la identificació d'antibiòtics alternatius, efectius i fàcils d'administrar per al seu tractament.

L'assaig clínic que es presenta en aquesta tesi forma part d'un projecte de col·laboració anomenat TrepAB entre la Fundació Lluita contra les Infeccions de l'HUGTP a Badalona (Dr. Oriol Mitjà, Investigador Principal) i la Universitat de Washington a Seattle (Dr. Lorenzo Giacani, Investigador Col·laborador). El propòsit d'aquest projecte és readaptar antibiòtics aprovats per a altres infeccions bacterianes per al seu ús en el tractament de la sífilis.

El compost ideal per a tractar la sífilis hauria d'aconseguir assolir concentracions efectives en els teixits diana del T.p., especialment al SNC, per assegurar una millor eliminació de les espiroquetes que podrien haver-lo envaït i prevenir la neurosífilis. Per tant, seria un fàrmac capaç de penetrar amb eficàcia al SNC. El tractament actual de la neurosífilis s'administra per via parenteral i aquest fet és una limitació en països o regions amb sistemes de salut limitats, on l'administració parenteral és inviable. El compost ideal s'administraria per via oral i preferentment en règim curt per millorar l'acceptació i el compliment del pacient.

### Investigacions prèvies a l'assaig en la readaptació de fàrmacs per tractar la sífilis

A continuació s'expliquen les investigacions dutes a terme dins del projecte TrepAB abans del desenvolupament de l'ACA que forma part d'aquesta tesi: la identificació de molècules candidates i els estudis *in vitro* i en el model animal per a seleccionar el fàrmac candidat per a tractar la sífilis.

### *Recerca de molècules terapèutiques candidates*

El T.p. és un patogen extracel·lular que es beneficia d'envair els teixits viscerals i musculoesquelètics profunds, i de sobreviure en llocs distals de la pell i les mucoses per tal de millorar les oportunitats de transmetre's durant els estadis posteriors de la infecció. Una exposició prolongada a fàrmacs als teixits on predomina el bacteri es considera un dels principals requisits per al tractament de la sífilis. A causa de la preocupació per la neurosífilis asimptomàtica, es buscava un antibiòtic neuropenetrant oral. El nostre grup de recerca ha realitzat una revisió de la literatura, cercant antimicrobians que tinguessin les característiques farmacològiques següents:

1. Activitat coneguda contra el T.p. (és a dir, penicil·lina, ceftriaxona, cefetamet, ceftizoxima, cefmetazol, aztreonam, eritromicina, claritromicina, azitromicina, doxiciclina, tetraciclina i cloramfenicol)<sup>55-64</sup> o altres espiroquetes patògenes com *Borrelia burgdorferi* i *Leptospira spp.* (és a dir, moxifloxacina, tigeciclina, linezolid).<sup>65,66</sup>
2. Bona absorció oral (90-100 %).
3. Volum de distribució d'uns 70 litres/kg o més.

4. Baix nivell d'unió a proteïnes plasmàtiques menor al 30 % (ja que només la fracció no lligada del plasma pot penetrar lliurement per la barrera hematoencefàlica).
5. Quocient LCR– sèrum proper a 1,0 (és a dir, molècules petites i lipòfiles).
6. Capacitat per assolir els teixits perifèrics (és a dir, la pell).

Un dels candidats més prometedors va ser el grup de les oxazolidinones: són fàrmacs potencialment actius enfront del T.p./espiroquetes patogèniques,<sup>67,68</sup> són neuropenetrants<sup>69</sup> (per exemple, la penetració al SNC del linezolid és del 70 %, enfront del 15 % de la penicil·lina) i poden administrar-se per via oral i en pauta curta per millorar l'adherència i el compliment del tractament.<sup>70</sup>

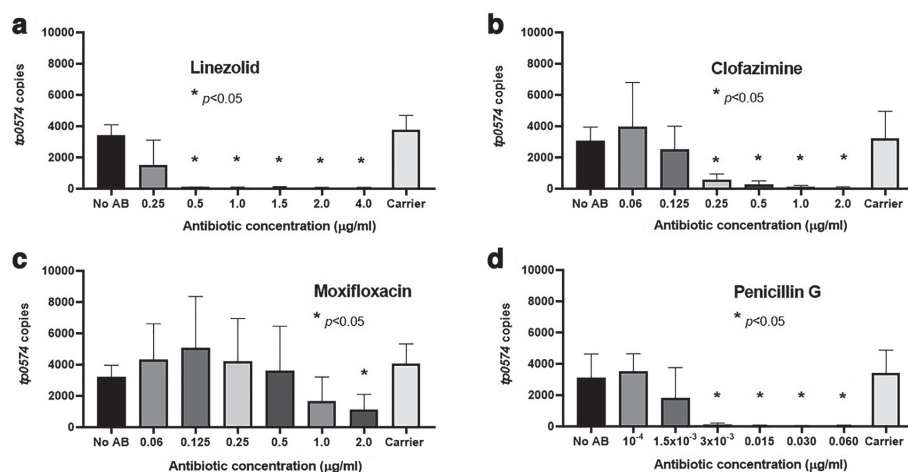
### ***Model in vitro: cultiu cel·lular***

Fins a l'any 2018, les proves de fàrmacs antisifilítics havien de desenvolupar-se en el context d'una infecció d'un hoste perquè el T.p. no es podia cultivar; i per testar la resistència als antibiòtics només es podia realitzar mitjançant mètodes moleculars indirectes.<sup>64</sup> El nostre centre col·laborador a la Universitat de Washington a Seattle (laboratori del Dr. Lorenzo Giacani) ha realitzat estudis preclínic amb linezolid adaptant per primera vegada el sistema de cultiu tissular *in vitro* per T.p. desenvolupat per Edmonson et al.<sup>54</sup>

En aquests estudis es pretenia determinar l'eficàcia i la concentració mínima inhibidora (CMI) dels antimicrobians estudiats. Es van crear medis específics per cada antibiòtic proposat, diluït a diferents concentracions, i amb diversos mecanismes de control. A continuació, s'hi sembraven 30.000 soques de T.p. SS14 i s'incubaven a 34°C durant 7 dies. Al cap de 7 dies, es realitzava una PCR quantitativa (qPCR) contra el gen *tp0574* per mesurar la càrrega d'ADN de T.p. en cada concentració d'antibiòtic i així determinar el creixement bacterià després d'haver estat exposat a l'antibiòtic a diferents concentracions. Per altra banda, d'un dels pous es prenién els T.p. viables i es ressebraven en una segona placa sense antibiòtic per comprovar la viabilitat dels T.p. després de l'exposició als antibiòtics. Al cap de 7 dies, es realitzava una segona qPCR i així es determinava si els antibiòtics testats tenien activitat treponemicida.

Es va observar que una concentració de 0,5 µg/ml de linezolid o superior inhibia el creixement del T.p. (**Figura 6**). També es va observar que el linezolid tenia efecte treponemicida, ja que els T.p. no creixien després de la ressebra realitzada després de l'exposició a l'antibiòtic.<sup>71</sup>





**Figura 6.** Resultats de la CMI calculada en el model *in vitro*, a través de l'amplificació per qPCR del gen *tp0574* en cultius de T.p. tractats i controls.<sup>71</sup>

### *Model in vivo: model animal*

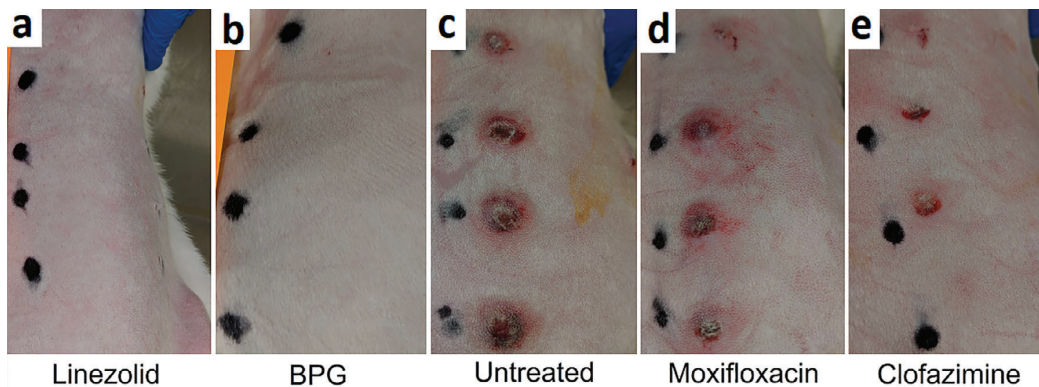
Es va utilitzar el model animal de sífilis amb conills per testar el linezolid, que actualment encara es considera el mètode més fiable per provar la susceptibilitat del T.p. als agents antimicrobians.<sup>72,73</sup>

Es va realitzar el següent estudi com a prova de concepte. Un total de 15 conills van ser infectats el mateix dia, de forma intradèrmica, en 8 localitzacions cadascun a l'esquena. Posteriorment, els conills es van aleatoritzar en diferents branques de tractament. Després de la infecció, tots els animals van desenvolupar signes clínics d'infecció. El tractament antibiòtic es va iniciar 7 dies després de la inoculació intradèrmica, moment en el qual almenys 2 dels llocs d'inoculació en cada conill mostraven els T.p. visibles per camp fosc. Posteriorment, es va fer un seguiment de la progressió de les lesions fins a dia 40 després de la inoculació, on s'avaluava:

- la clínica registrant el diàmetre i la induració de cada lesió;
- el camp fosc mitjançant aspirats amb agulla;
- les biòpsies cutànies de les lesions per a dur a terme la qPCR (contra el gen *tp0574*);
- el sèrum per a realitzar proves treponèmiques FTA-ABS i no-treponèmiques VDRL.

En els animals tractats amb PGB i linezolid, les lesions van curar a dia 15, a diferència dels altres grups de conills en què les lesions van progressar (**Figura 7**). L'avaluació de la càrrega bacteriana del T.p. a les lesions cutànies per camp fosc i per qPCR va mostrar que no es

detectava el T.p. en les lesions dels animals tractats amb PGB a partir del dia 3 després del tractament i en els conills tractats amb linezolid a partir del dia 8 després del tractament. Les serologies van mostrar que els animals tractats amb PGB i linezolid no van seroconvertir durant tot el període d'observació, a diferència dels altres grups que van esdevenir positius entre les setmanes 2-3.



**Figura 7.** Curació de la infecció per T.p. en el model en conill. Imatges clíniques de l'evolució de les lesions cutànies. [Els quatre punts negres de l'esquerra de cada imatge són les marques del retolador per identificar el lloc de la inoculació intradèrmica del T.p.]<sup>71</sup>

Es va realitzar el Test d'Infectivitat del Conill, a través dels ganglis limfàtics poplitis dels conills dels grups tractats amb PGB i linezolid i del grup control no tractat. El conill receptor dels ganglis limfàtics del grup control va desenvolupar orquitis i va seroconvertir un mes després de la inoculació, a diferència dels conills que havien rebut la inoculació de gangli provinent del grup PGB o linezolid, que no van desenvolupar la infecció. Tampoc es van detectar anomalies destacables al LCR del SNC. Els resultats d'aquests experiments van demostrar que el linezolid és tan eficaç com la PGB en el tractament de la sífilis en el model animal amb conill.<sup>71</sup>

### Linezolid

Els resultats presentats de les proves *in vitro* i *in vivo* suggereixen que el linezolid és un candidat prometedor per ser testat en un ACA de sífilis en humans.

### ***Indicacions aprovades del linezolid i seguretat***

El linezolid és una oxazolidinona sense patents i de baix cost que actua inhibint la síntesi de proteïnes. El linezolid s'uneix al ribosoma bacterià (23S de la subunitat 50S) i impedeix la

formació del complex d'iniciació funcional 70S, que és un component essencial per al procés d'iniciació de la traducció proteica. Es va aprovar per a ús clínic als Estats Units d'Amèrica (EUA) l'abril del 2000 i posteriorment s'ha aprovat en altres països per tractar infeccions causades per microorganismes Gram positius, principalment la pneumònia adquirida a la comunitat, les infeccions de la pell i dels teixits tous complicades i no complicades, i per infeccions causades per *Staphylococcus aureus* resistents a la meticil·lina i enterococs resistents a la vancomicina.<sup>74</sup>

El linezolid té una alta penetració al SNC i una excel·lent biodisponibilitat oral. L'experiència publicada en sèries de casos amb linezolid en infeccions del SNC (incloent-hi meningitis i abscessos cerebrals) indiquen que és una alternativa segura per a les infeccions del SNC resistents a la teràpia convencional.<sup>69,75,76</sup> Tot i que no es reconeix aquesta indicació a la fitxa tècnica del linezolid, ja apareix en alguna guia de meningitis.<sup>77</sup> A més, el linezolid sembla ser eficaç per al tractament de les infeccions per nocardiosi i listeriosi en un nombre limitat de casos publicats.<sup>67,68</sup>

El linezolid està contraindicat en casos d'hipertensió arterial no controlada, feocromocitoma, tirotoxicosis, síndrome carcinoide o trastorn psicoafectiu incapacitant, pel risc de crisis hipertensives. El linezolid és un inhibidor reversible i no-selectiu de l'enzim monoaminoxidasa (MAO) i determinats fàrmacs poden interaccionar-hi: inhibidors de la MAO, inhibidors selectius de la recaptació de serotonina (ISRS), antidepressius tricíclics, agonistes del receptor de serotonina 5-HT<sub>1</sub>, agents simpaticomimètics, agents dopaminèrgics i adrenèrgics, fàrmacs estimulants del SNC i narcòtics opioïdes, pel risc de síndrome serotoninèrgic. Tot i així, el risc de desenvolupar aquestes complicacions és molt rar, reportat en menys del 0,5 % dels casos.<sup>78</sup>

Pel que fa a altres efectes adversos, els més freqüents són la diarrea, les nàusees i la cefalea. Però determinats efectes adversos requereixen una monitorització: la mielosupressió, la neuropatia (perifèrica i òptica) i l'acidosi làctica, ja que poden limitar l'ús del linezolid per a durades prolongades d'almenys 14 dies.<sup>79-81</sup> Per pautes curtes de menys de 7 dies, el linezolid és un medicament segur i no requereix monitorització, segons les recomanacions clíniques.

### *Farmacologia i justificació del règim de dosi del linezolid*

La dosi estàndard recomanada del linezolid és de 600 mg/12 hores durant 10-14 dies;<sup>74</sup> tot i així, el linezolid 600 mg/24 hores s'ha utilitzat fora de fitxa tècnica per al tractament de la tuberculosi multiresistent.<sup>82</sup> La dosificació i la freqüència del linezolid proposades per a aquest estudi es basa en les seves característiques farmacocinètiques i farmacodinàmiques.

Segons la informació de la fitxa tècnica,<sup>74</sup> la farmacocinètica d'una dosi única de linezolid 600 mg dona lloc a una concentració màxima (C<sub>max</sub>) de 12,7 mg/L, el temps on la concentració és màxima (T<sub>max</sub>) és de 1,28 hores, té una semivida de 4,26 hores, l'àrea sota la corba de concentració-temps de 24 hores (AUC<sub>24h</sub>) és de 91,4 µg·h/ml i l'AUC<sub>24h</sub> al SNC és de 63,9 µg·h/ml. L'AUC lliure (fAUC<sub>24h</sub>) és de 64,0 µg·h/ml i l'fAUC<sub>24h</sub> al SNC és de 44,8 µg·h/ml.

El linezolid pertany a una classe d'antibiòtics dependents del temps, majoritàriament bacteriostàtics, amb baix efecte postantibiòtic i un 30 % s'uneix a proteïnes plasmàtiques. Els nostres estudis preclínic utilitzant qPCR i el sistema de cultiu *in vitro* de T.p. indiquen que la CMI del linezolid per T.p. és de 0,5 µg/ml.<sup>71</sup>

L'objectiu farmacocinètic (PK) farmacodinàmic (PD) per aconseguir eficàcia és aconseguir un quocient fAUC<sub>24h</sub>/CMI major de 100, que s'ha demostrat que prediu l'eficàcia clínica per a altres infeccions bacterianes.<sup>83</sup> Tenint en compte que fAUC<sub>24h</sub> és de 64,0 µg·h/ml,<sup>74</sup> i la CMI de 0,5 µg/ml,<sup>71</sup> el quocient fAUC/MIC seria de 128, superior a 100 que correspondria al valor d'eficàcia clínica (**Taula 2**).

La durada òptima del tractament per a la sífilis precoç es desconeix i no s'ha avaluat en ACA. Hi ha pocs estudis observacionals que avaluïn diferents pautes de dosificació per a tractar la sífilis.<sup>84,85</sup> En els experiments originals d'Eagle i col·laboradors, el T.p. s'eliminava dels xancres si els nivells de penicil·lina es mantenien durant un període de 2-3 dies.<sup>57,86</sup> Tot i així, es va considerar que calia una exposició prolongada durant un període de 5-7 dies per aquells T.p. que afectaven els ganglis limfàtics i teixits, a causa del creixement lent d'aquests bacteris (el temps de multiplicació del T.p. és de 35-40 hores).<sup>87</sup>

Tenint en compte que per curar la sífilis cal mantenir nivells treponemicides de fàrmacs durant almenys 5-7 dies, tal com ocorre amb la PGB IM,<sup>57,86</sup> serà necessari un règim de linezolid d'almenys 5 dies una vegada al dia. Aquest règim de dosificació tan simple afavoriria una major

adherència al tractament,<sup>88</sup> tenint en compte la importància que té aquest fet en els països amb rendes baixes, amb mal accés a les instal·lacions sanitàries i problemes per al compliment dels tractaments.

**Taula 2.** Paràmetres farmacocinètics i farmacodinàmics del linezolid.

CMI	AUC24/CMI	fAUC24/CMI	AUC-SNC/ CMI	fAUC-SNC/CMI
4	22,9	16,0	16,0	11,2
2	45,7	32,0	32,0	22,4
1	91,4	64,0	64,0	44,8
<b>0,5</b>	<b>182,8</b>	<b>128,0</b>	<b>128,0</b>	<b>89,6</b>
0,25	365,6	255,9	255,9	179,1
0,125	731,2	511,8	511,8	358,3
0,06	1523,3	1066,3	1066,3	746,4
0,03	3046,7	2132,7	2132,7	1492,9

**Llegenda Taula 2.** CMI: Concentració Mínima Inhibitòria, expressada en µg/ml; AUC24: Àrea sota la Corba de concentració–temps de 24 hores; fAUC24: Àrea sota la corba lliure de 24 hores; SNC: Sistema Nerviós Central.<sup>54</sup>

### *Resistències al linezolid*

Mutacions en el gen 23S rRNA s’han descrit com a mecanisme de resistència al linezolid conegut en diverses espècies. El genoma del T.p. té 2 gens que codifiquen pel 23S rRNA. De fet, algunes soques del T.p. són resistents als macròlids degut a mutacions en el 23S rRNA. Per tant, el risc d’aparició de resistència al linezolid mitjançant la selecció de mutacions en el gen 23S rRNA ribosomal s’ha de tenir en compte i fer-ne un seguiment. Per avaluar la probabilitat d’aquest esdeveniment, en el laboratori del Dr. Giacani es va cultivar el T.p.SS14 durant 10 setmanes en concentracions subterapèutiques de linezolid (~ 30 ng/ml). Al final de l’experiment, es va demostrar que la CMI del linezolid no s’havia modificat en aquests T.p., suggerint que no s’havia produït cap selecció de soques resistents.<sup>71,89</sup> També es va extreure ADN del T.p. per realitzar la WGS, com a forma alternativa d’investigar si havien aparegut mutacions que es podrien associar amb resistència al linezolid, amb els mateixos resultats.

## Justificació de l'estudi

Els estudis preclínic del projecte TrepAB han confirmat que el linezolid pot ser un antibiòtic prometedor per a tractar la sífilis. Per tant, un ACA és l'abordatge més adequat per avaluar si l'antibiòtic seleccionat és tan eficaç com la PGB per a curar la sífilis. Com s'ha comentat, el linezolid s'utilitzaria en el context d'escassetat de PGB i també seria una alternativa valuosa per als pacients al·lèrgics a la penicil·lina. A més, el nou règim de tractament proposat canvia una formulació injectable per una d'oral de règim breu, millorant la comoditat del tractament per part dels pacients.

## **2. Mpox, infecció pel virus de la verola del mico**

### Introducció

La infecció de la verola del mico o l'Mpox (inicialment anomenada *monkeypox*) és causada per un ortopoxvirus zoonòtic de doble cadena d'ADN, que pertany a la família de Poxvirus. Habitualment es troba a l'Àfrica Occidental i Central,<sup>90</sup> on una àmplia varietat d'animals, incloent-hi micos i rosegadors, actuen com a principals reservoris de la infecció. Dins del gènere ortopoxvirus hi ha múltiples altres virus, entre els quals destaquen el virus *Variola* (causant de la verola humana) i el virus *Vaccinia* (utilitzat per la vacuna d'aquesta).<sup>91</sup> Es coneix l'existència de dues soques del virus *Monkeypox* (MPXV): la soca I vinculada a la conca del Congo o Àfrica Central, associada a una major gravetat de la infecció, i la soca II vinculada a l'Àfrica Occidental, associada a una malaltia més lleu.

El virus es va identificar per primer cop l'any 1958 en un institut de recerca microbiològica a Copenhaguen (Statens Serum Institut). Es van identificar dos brots en els simis *Macacos asiàtics* del centre de recerca, amb símptomes i lesions cutànies que recordaven la verola humana.<sup>92</sup> L'any 1970 es va detectar per primera vegada la infecció pel MPXV en humans, en un nen de 9 anys de la República Democràtica del Congo (RDC) amb una clínica que també recordava la verola humana, però aquesta malaltia havia estat declarada erradicada en aquest país l'any 1968. Després que l'any 1980 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) considerés la verola humana oficialment erradicada (l'últim cas s'havia descrit l'any 1977 al continent africà), i des d'aleshores disminuïssin els programes de vacunació, l'Mpox ha esdevingut l'ortopoxvirus més important a escala global.

Els casos de contagi entre humans en zones endèmiques es van descriure durant els anys posteriors al 1980, normalment donant lloc a petites cadenes de transmissió, però també van ocórrer brots més nombrosos.<sup>93,94</sup> També s'han registrat casos importats d'Mpox en diversos països fora de zones endèmiques, normalment associats a viatges a regions endèmiques o amb el contacte amb animals importats infectats.<sup>95,96</sup> L'any 2003 es va produir el primer brot fora del continent africà, als EUA, que va afectar fins a 71 persones de diversos estats. L'estudi epidemiològic va demostrar que tots els casos tenien un nexa amb la importació de gossets de la prada, que s'havien contagiats de petits rosegadors exòtics importants des de Ghana.<sup>97</sup> Posteriorment, l'any 2017 i 2018 es va identificar el brot endèmic més important amb 122 casos afectats a Nigèria, després de 39 anys sense reportar-se cap cas d'Mpox. Aquest brot es va produir en zones endèmiques i es va descriure la transmissió de persona a persona.<sup>98</sup> Des d'aleshores, s'han reportat diversos casos aïllats d'Mpox en països com Regne Unit (7 casos de 2018 a 2021), Israel (2018), EUA (2021) i Singapur (2019), sempre mantenint un nexa epidemiològic amb àrees endèmiques.<sup>99-102</sup>

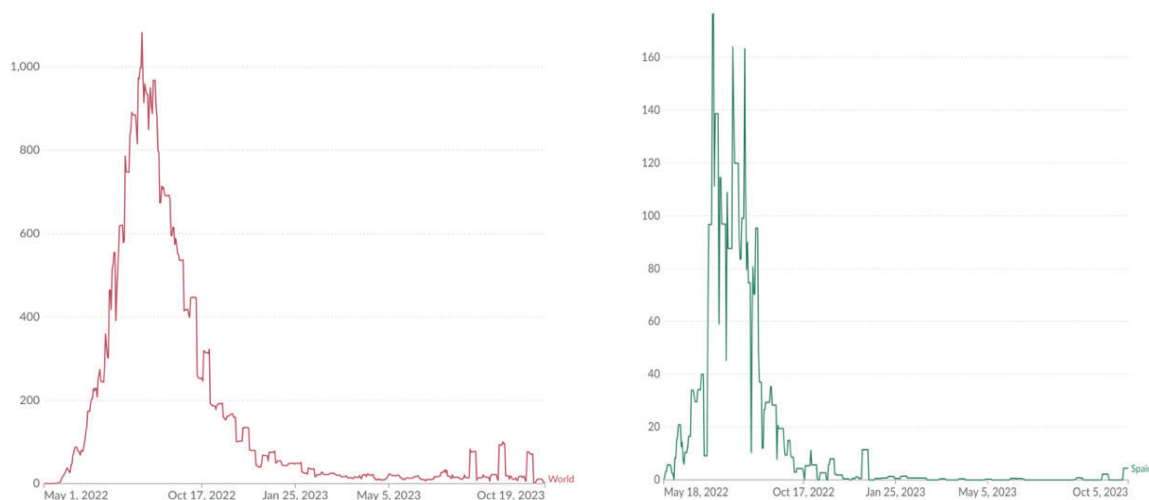
### Mecanismes de transmissió descrits abans de l'any 2022

Encara que s'hagi anomenat originalment virus de la verola del mico, l'hoste principal d'aquest virus són petits rosegadors com rates o esquirols. El contacte amb els mateixos o mossegades d'aquests pot transmetre el virus als humans. Paral·lelament, el contacte d'aquests rosegadors amb petits primats pot transmetre'ls també a aquests la infecció. El consum de carn de primats poc processada o el contacte amb aquests animals en zones de jungla en àrees endèmiques suposa una altra font de contagi.<sup>103</sup> A més, el virus es pot transmetre entre humans a través de 4 mecanismes:<sup>103,104</sup> per contacte directe amb les lesions cutànies de persones infectades, mitjançant gotes respiratòries (requerint-se un contacte molt estret i perllongat), a través del contacte amb roba o objectes contaminats (tot i que amb un paper menys important) i també s'ha descrit la transmissió vertical, podent causar avortaments i morts neonatals.<sup>105</sup> El període de transmissibilitat s'ha descrit des de l'inici dels primers símptomes, principalment quan apareixen les lesions cutànies, i fins que totes elles hagin curat i s'hagin després les crostes.

### Brot d'Mpox de l'any 2022

L'any 2022 es va produir un brot d'Mpox caracteritzat perquè els afectats no tenien història documentada de cap viatge a països endèmics o d'haver estat exposats a animals importats de

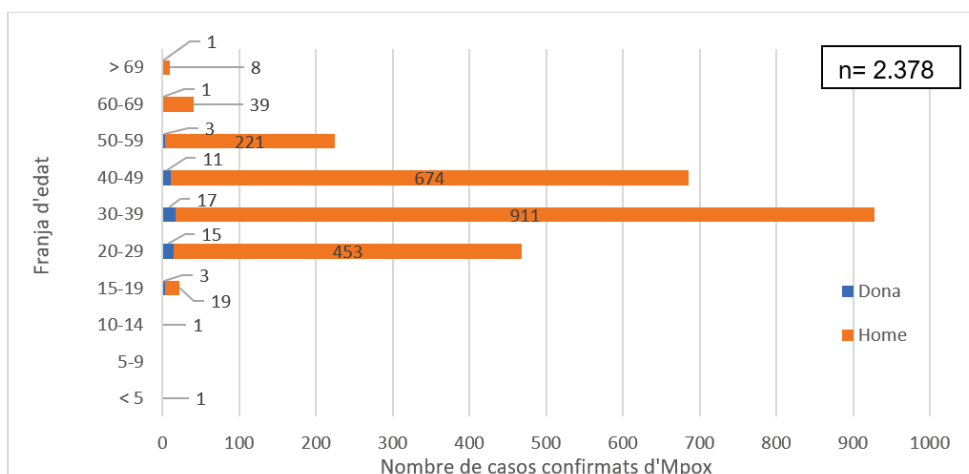
zones endèmiques. Els casos d'infecció pel MPXV es van detectar a Anglaterra a partir del 6 de maig de 2022 i es van estendre ràpidament per tot Europa i la resta del món. El dia 23 de juliol de 2022, el director general de l'OMS va declarar el brot d'Mpox com una situació d'emergència de salut pública d'importància internacional, a causa de la propagació mundial sense precedents de la malaltia fora de països africans endèmics.<sup>106</sup> El pic del brot va ser durant el mes d'agost de 2022, on es van diagnosticar més casos arreu del món. Es van registrar un total de 93.497 casos en 118 països arreu del món (registrats fins el març de 2024),<sup>107</sup> sent els països amb major nombre de casos diagnosticats: EUA, Brasil i Espanya (**Figura 8**).<sup>107</sup> La mortalitat és menor al 0,1 %, s'han registrat un total de 177 morts, amb major nombre de casos registrats: EUA, Mèxic, Perú i Brasil (registrats fins el març de 2024).<sup>107</sup>



**Figura 8.** Casos confirmats acumulats d'Mpox a escala global (esquerre, en vermell) i a Espanya (dreta, en verd), novembre 2023.<sup>108</sup>

A Espanya s'han registrat un total de 7.786 casos d'Mpox (fins al març de 2024) en 17 comunitats autònomes, principalment a Catalunya i Madrid. El primer cas es va diagnosticar a Espanya el dia 26 d'abril de 2022. Durant l'any 2023 es van registrar un total de 229 casos<sup>5</sup> i posteriorment 12 casos des de gener de 2024 (comunicats fins al març de 2024).<sup>109</sup> S'han registrat 3 casos de mort a Espanya: 2 casos per meningoencefalitis i un cas presentava Mpox disseminada amb múltiples complicacions associades.<sup>5</sup> A Catalunya, fins al mes de novembre de 2023 s'havien confirmat 2.379 casos, la majoria d'ells a Barcelona (**Figura 9**).<sup>110</sup>





**Figura 9.** Nombre de casos confirmats d'Mpox per grups d'edat i gènere a Catalunya, novembre 2023.<sup>110</sup>

L'epidèmia ha afectat principalment a homes gais i bisexuals que tenen sexe amb homes, amb una edat mitja de 30-44 anys, la majoria amb factors de risc en l'àmbit sexual (és a dir, tenir múltiples parelles sexuals, haver tingut altres ITS, utilitzar aplicacions per mantenir relacions sexuals i/o haver practicat *Chemsex*, en l'últim any). Les sèries descriuen que fins al 40 % de la població afectada tenia infecció pel VIH i un 40 % prenia profilaxi preexposició contra el VIH (PrEP).<sup>111-113</sup> Els afectats no tenien història documentada d'haver realitzat viatges a països endèmics ni d'haver tingut contacte amb animals importats de zones endèmiques, suggerint com a principal mecanisme de transmissió el contacte directe amb material infecciós de lesions cutànies o mucoses que es produeix a través del contacte íntim durant les relacions sexuals.<sup>112-114</sup> A més, la constatació en diversos estudis de càrregues virals (CV) més elevades en les lesions cutànies en comparació amb les CV de les vies respiratòries superiors, reforça la teoria que ha estat el contacte pell amb pell el principal mecanisme de transmissió de l'Mpox en el brot de 2022, mentre que la transmissió respiratòria ha estat molt menys rellevant.<sup>113</sup> El patogen s'ha identificat com la soca I1b del MPXV, vinculada a Àfrica Occidental i associada a malaltia lleu. No obstant això, s'han identificat algunes mutacions en la soca responsable d'aquesta epidèmia en les proteïnes involucrades en la transmissió del virus i la virulència.<sup>104</sup>

El dia 28 de novembre de 2022, l'OMS va decidir canviar el nom de la verola del mico pel d'Mpox.<sup>115</sup> Organitzacions no-governamentals, alguns estats i activistes, tant africans com de

la comunitat LGBTIQ+, havien sol·licitat el canvi de nom, ja que el nom anterior s'associava a etiquetes que podien conduir a la discriminació i visió esbiaixada de la història natural d'aquesta malaltia. Finalment, l'11 de maig de 2023, el director general de l'OMS, després de la disminució dràstica del nombre de casos, va determinar que el brot deixava de constituir una emergència de salut pública global.<sup>116</sup>

### Patogènia

Per tal d'entendre millor la presentació clínica i la transmissió dels casos d'Mpox del brot de 2022, és important intentar entendre la fisiopatologia del MPXV. Per aconseguir-ho ens podem ajudar dels estudis antics d'altres ortopoxvirus, com la verola humana, o bé d'estudis d'Mpox en primats. En el model amb primats, s'observava que aquells animals infectats amb la soca I tenien major afectació sistèmica i major CV en sang perifèrica, que aquells infectats per la soca II. A més, en aquells animals infectats per inoculació dèrmica per la soca II, la replicació del virus es focalitzava principalment a la pell i en adenopaties locals, a diferència dels infectats per inoculació dèrmica per la soca I, on la infecció generalitzava amb més freqüència.<sup>117</sup> Pel que fa als estudis de verola humana, tot i que és conegut que la verola es pot transmetre per via respiratòria i produir lesions cutànies generalitzades, també és conegut que es pot transmetre per inoculació local dèrmica, causant lesions cutànies localitzades o restringides a una localització corporal, amb lesions satèl·lit al voltant del punt d'inoculació i amb la possibilitat de generalitzar-se posteriorment.<sup>118</sup> Quan la infecció es produeix per via respiratòria, el virus passa dels bronquíols (dia 2), a les adenopaties regionals i al sistema reticuloendotelial (dia 4), des d'on pot disseminar per la sang (dia 6) a diferents òrgans i acabar produint lesions cutànies generalitzades (dia 8).<sup>119</sup> Al segle XVIII, la inoculació intencionada o variolació era la forma més comuna d'infecció cutània localitzada i s'observaven lesions cutànies concentrades en el punt d'inoculació o al seu voltant.<sup>118</sup> La variolació s'aconseguia fent una incisió profunda a través de la pell per inocular el virus. En 48 hores, es formava una petita pàpula que creixia durant 2-3 dies. El 7è dia podien aparèixer lesions satèl·lit, el 8è dia podia aparèixer dolor a l'aixella i els símptomes generals podien aparèixer amb febre i cefalea el 9è dia; finalment podia aparèixer o no una erupció disseminada cap al 9è dia.<sup>118</sup> Per tant, depenent de la soca de MPXV que causi la infecció, tindrà tropisme per determinats òrgans i una major o menor virulència, i depenent de la via per la que es produeixi la infecció, els pacients presentaran unes o altres manifestacions clíniques.<sup>104</sup>

## Manifestacions clíniques del brot de l'any 2022

Els pacients afectats durant el brot d'Mpox del 2022 presentaven canvis respecte a la clínica de l'Mpox endèmica. Històricament, els símptomes de l'Mpox endèmica implicaven l'aparició d'una erupció característica de lesions múltiples (des de 10 fins a 150) i monomorfes, en el mateix estadi evolutiu, en forma de pàpules i plaques vesículo-umbilicades i pseudo-pustuloses, que afectaven a diverses regions del cos, com ara la cara, els braços, les cames i, amb menys freqüència, els palmells, les plantes o els genitals.<sup>104</sup> L'erupció generalment anava precedida de símptomes prodròmics com ara febre, limfadenopaties i símptomes semblants a la grip. A continuació es descriuen en detall les manifestacions dels casos del brot de 2022.

### *Símptomes sistèmics*

Després d'un període d'incubació de 6-7 dies, més curt que el descrit en les formes endèmiques (12 dies), apareixen els símptomes sistèmics i les lesions cutànies.<sup>104</sup> Els símptomes sistèmics apareixen en el 88 % dels casos en forma de quadre pseudogripal: cefalea, odinofàgia, febre, artromiàlgies i astènia. Fins al 48 % dels casos, la clínica sistèmica o prodròmica precedeix en pocs dies l'aparició de lesions cutànies.<sup>111</sup> S'han descrit diversos casos amb absència de símptomes prodròmics o poca intensitat dels mateixos en el brot de 2022.

### *Manifestacions cutànies i mucoses*

Inicialment apareix l'erupció localitzada o primària, limitada en una regió corporal, generalment a les zones genital, perianal o perioral, que sovint no es generalitza a altres parts del cos, a diferència de la forma endèmica. Les lesions són pàpules umbilicades, dures, de color blanquinós, amb centre necròtic que s'ulcera. Poden ser lesions úniques, però més sovint són lesions múltiples, i localitzades a la zona d'inoculació. S'acompanyen d'edema perilesional, dolor i adenopaties locoregionals palpables. A la mucosa oral poden observar-se aftes i a la zona perioral lesions de característiques similars a les de la zona genital (**Figura 10A-B-C**).<sup>113</sup> La localització de les lesions primàries s'ha vist que té relació amb les pràctiques sexuals. S'ha vist que els pacients que practicaven sexe anal receptiu, amb més freqüència presentaven lesions perianals, periorals i proctitis, en comparació amb els pacients que no practicaven sexe anal receptiu.<sup>111</sup>

Posteriorment, dies més tard, apareixen lesions cutànies a distància, que poden afectar qualsevol localització corporal i poden ser pruriginoses. Aquestes lesions solen ser de menor mida, són heterogènies entre elles i presenten diferents estadis evolutius: poden ser màcules, pàpules, vesícules, pústules i crostes.<sup>113,103</sup> També s'han descrit exanemes maculopapulars en el 4-13 % de les sèries,<sup>112,120</sup> que solen afectar a tronc i arrel d'extremitats, a vegades abans de l'aparició d'altres lesions cutànies, i és important identificar-lo perquè la seva presència pot confondre el diagnòstic inicial, especialment si l'exantema ha aparegut abans d'evidenciar altres lesions cutànies més suggestives d'Mpox (**Figura 10D-E**). Les manifestacions cutànies solen tardar entre 2-4 setmanes en epitelitzar.

### *Complicacions locals*

S'han descrit diverses complicacions en el brot d'Mpox de 2022, algunes locals i altres de sistèmiques, essent algunes d'elles no prèviament descrites en les formes endèmiques.

Les sèries descriuen que fins a un 4 % dels pacients presenta sobreinfecció bacteriana de les lesions cutànies, que cal tractar amb antibiòtic i/o drenatge quirúrgic en cas de presentar abscessos cutanis.<sup>120</sup>

S'han detectat casos de proctitis en un 14-36 % dels casos de les sèries, en forma de dolor anorectal intens, tenesme rectal i secreció purulenta o sagnat.<sup>112,111,120</sup> Aquests casos poden anar associats o no a lesions ulcerades a la zona perianal i requereixen un important maneig del dolor. Els pacients amb proctitis solen tenir l'antecedent d'haver practicat sexe anal receptiu i presenten amb més freqüència símptomes sistèmics abans de desenvolupar lesions a la pell.<sup>111</sup> Com a complicació de la proctitis, s'han descrit casos de perforació rectal.<sup>120</sup>

Les faringitis ulceratives s'han descrit en un 10-21 % dels casos de les sèries.<sup>111,112</sup> Es manifesten en forma de plaques purulentes ulcerades, a vegades unilaterals, acompanyades d'adenopaties cervicals locals, odinofàgia, febre i clínica sistèmica. Presenten antecedents d'haver realitzat sexe oral receptiu,<sup>111</sup> poden acompanyar-se de disfàgia i comporten un risc de compromís de la via aèria (**Figura 10F**).

En el 8-15 % dels casos s'ha descrit edema prepucial o edema del gland del penis que resulta en parafimosi i pot suposar un risc d'obstrucció de la via urinària.<sup>111,120</sup>

En casos aïllats s'han descrit lesions cutànies necròtiques localitzades, i fins al 13 % dels casos s'han descrit cicatrius després de la curació de les lesions cutànies.<sup>121</sup>



**Figura 10.** Imatges clíniques de pacients amb Mpox visitats en el brot 2022 a la Unitat d'ITS on treballava la doctoranda durant la realització de la tesi. **A:** pàpules i plaques umbilicades amb centre necròtic en zona genital i pubis. **B:** pàpules i plaques umbilicades i amb centre ulcerat en zona perianal. **C:** gran placa ulcerada amb centre necròtic i eritema perilesional en regió perioral dreta. **D:** pàpules, vesícules i pústules umbilicades a tronc i extremitats. **E:** exantema maculopapular a tronc. **F:** placa ulcerada purulenta a amígdala dreta en un pacient amb faringitis ulcerativa. Es disposa del permís per a la publicació d'aquestes imatges.

### *Complicacions sistèmiques*

Amb menys freqüència s'han descrit complicacions sistèmiques, sobretot en el sistema nerviós i oculars. També s'han descrit lesions cutànies disseminades i casos de sèpsies secundàries a la sobreinfecció d'aquestes. Menys sovint s'ha descrit afectació pulmonar, miocarditis i úlceres en el tracte gastrointestinal.<sup>122</sup>

Les complicacions neurològiques es descriuen en menys d'un 3 % dels casos. Hi ha el dubte de si són degudes a un dany viral neurològic directe o bé a una resposta immunomediada al virus. Les complicacions més freqüents són: les convulsions, la confusió i l'encefalitis.<sup>123</sup>

Les complicacions oculars en aquest brot s'han descrit fins a l'1 % dels casos; han resultat ser menys freqüents que en brots previs. També existeixen dubtes de si són secundàries a la disseminació viral sistèmica o bé a un procés d'autoinoculació. Hi ha diverses manifestacions descrites, algunes de menys greus, com la blefaroconjuntivitis, o bé d'altres de més greus, com la queratitis, que pot conduir a una pèrdua de visió permanent.<sup>124</sup>

S'han descrit manifestacions cutànies greus en pacients amb infecció pel VIH i la SIDA.<sup>125</sup> Aquests casos poden presentar múltiples úlceres, amb centre necròtic, important inflamació perilesional i poden afectar qualsevol part del cos de forma disseminada. Les lesions en localitzacions genitals i facials suposen una important limitació funcional pel pacient. Les lesions en aquests pacients tarden molt a epitelitzar i amb freqüència se sobreinfecten causant un pronòstic fatal. Alguns d'aquests pacients també poden presentar afectació pulmonar en forma de nòduls bilaterals, perivasculars i difusos o bé una afectació pulmonar amb patró intersticial. Els pacients amb SIDA que presenten més complicacions són els pacients amb CD4 inferiors a 100 cèl·lules/mm<sup>3</sup>.<sup>126</sup> I dins del grup d'individus amb CD4 inferiors a 100 cèl·lules/mm<sup>3</sup>, la mortalitat s'ha vist que és més elevada en aquells individus amb càrregues virals elevades (>4log<sub>10</sub> còpies/ml). S'ha descrit una taxa de mortalitat de fins al 15 % en aquesta població.<sup>126</sup>

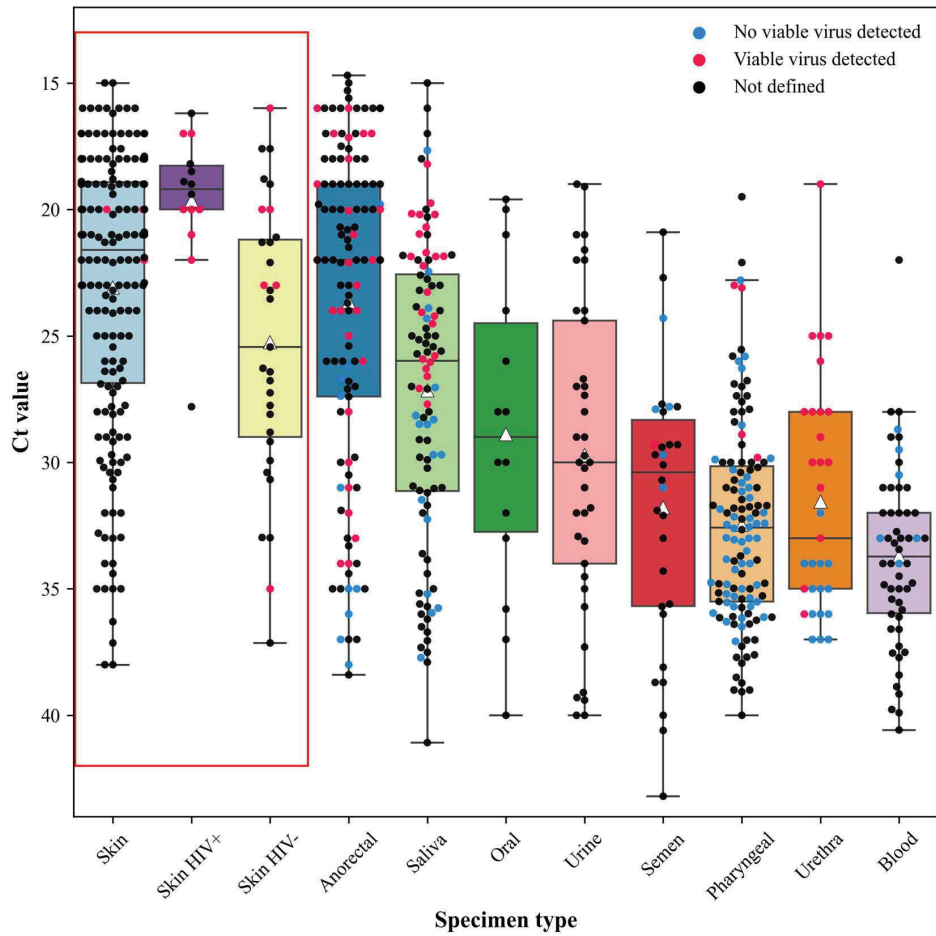
Per altra banda, s'han descrit ITS concomitants en pacients amb Mpox en el 17-70 % dels pacients en diferents sèries.<sup>111,113</sup> Per tant, és important realitzar sempre un cribratge d'altres ITS en el moment del diagnòstic d'un cas d'Mpox.

## Estudis moleculars

El diagnòstic de l'Mpox es basa en la detecció d'ADN viral mitjançant una PCR,<sup>127</sup> preferentment de les lesions cutànies, ja que són les més accessibles i la manifestació clínica més característica de la infecció.<sup>128</sup>

Durant el brot d'Mpox de 2022, s'ha pogut detectar el virus en diferents localitzacions corporals, incloses mostres de lesions cutànies, sang, saliva, faringe, orina, femta i semen.<sup>129</sup> Són diversos els estudis que mostren que en les lesions cutànies és on es troba una major CV del MPXV (**Figura 11**).<sup>111,130</sup> Pel que fa al seguiment virològic seriat, realitzat en un nombre reduït de persones, s'observa que l'eliminació viral és prolongada durant almenys 2-3 setmanes.<sup>96,131</sup> No obstant això, la freqüència i la durada amb què es troba l'ADN viral i el virus viable a cada localització corporal i la contribució relativa que cadascun d'ells té per la transmissió de l'Mpox no està clara.

Hi ha diversos estudis sobre dinàmica viral del MPXV, però amb petites mides mostrals, presa de mostres de forma inconsistent i durant períodes de seguiment breus. A més, la major part dels estudis fan servir la PCR per quantificar la presència de virus i molt pocs estudis realitzen cultius virals, ja que requereixen condicions de bioseguretat oportunes (**Taula 3**). La qPCR s'ha utilitzat per mesurar les CV en mostres de diferents localitzacions i el cultiu viral per confirmar la seva viabilitat. Tot i que cap dels dos paràmetres no es correlacionen directament amb la infectivitat del MPXV, poden ser indicadors d'aquesta. La CV del MPXV s'expressa a través del valor Ct de la qPCR, que indica el nombre de cicles de PCR que es necessiten per obtenir un resultat positiu. El Ct és inversament proporcional a la quantitat d'ADN viral. Generalment, un Ct menor indica una CV major, ja que hi ha una major quantitat d'ADN en la mostra i calen menys cicles de PCR per detectar-lo.



**Figura 11.** Càrrega viral (CV) del MPXV en diferents mostres de diferents localitzacions corporals. S'indiquen els virus viables detectats (punts vermells), els virus no viables detectats (punts blaus) i dels que no es va estudiar la viabilitat (punts negres). La CV s'expressa amb valors Ct. L'altura de les caixes indica els rangs interquartílics (RIC). La línia del centre de cada caixa indica la mediana i els extrems de cadascuna indiquen el Ct mínim i el Ct màxim de cada mostra. El triangle blanc indica el valor Ct mig a cada localització. Dintre del requadre vermell s'indica la CV de les mostres d'exsudat cutani (caixa blava) i a continuació es diferencien les CV d'exsudat cutani en funció de si es tracta de pacients infectats pel VIH (caixa lila) i pacients no infectats (caixa groga).<sup>130</sup>



**Taula 3.** Selecció d'estudis sobre la dinàmica viral del MPXV [revisats fins al gener de 2024].

Estudi	Inclusió	Mida mostra	Població	Mostres preses	Mesura	Seguiment	Resultats
Palich et al. 2023 <sup>132</sup>	2022	50 dia 0 24 dia 14	Ambulatoris (França)	356 (pell, anal, faringe, sang, orina, semen)	PCR	14 dies	Disminució CV a dia 14. Major CV a pell i anus.
Adler et al. 2022 <sup>96</sup>	2018-2021	7	Hospitalitzats (Regne Unit)	165 (sang, orina, pell, faringe)	PCR	27-77 dies	Eliminació viral fins a 22-39 dies.
Pittman et al. 2022 <sup>133</sup>	2007-2011	216	RDC (Soca I)	Pell, sang, faringe	PCR	75 dies	Major CV a pell. PCR positiva a faringe i sang abans de l'exantema.
Peiró-Mestres et al. 2022 <sup>129</sup>	2022	12	Ambulatoris (Espanya)	147 (pell, saliva, recte, faringe, semen, orina, femta)	PCR	4-16 dies	Major CV a pell.
Relhan et al. 2022 <sup>131</sup>	2022	5	Ambulatoris (Índia)	172 (faringe, sang, sèrum, pell, orina)	PCR	24 dies	Major CV a pell. PCR positives fins a dia 24.
Nörz et al. 2022 <sup>134</sup>	2022	16	5 hospitalitzats, 11 ambulatoris (Alemanya)	65 (pell, orofaringe, sang)	PCR Cultiu	20 dies	Major CV pell. Un total de 2/5 (40 %) cultius positius (cutanis).
Lim et al. 2023 <sup>135</sup>	2022	70	Ambulatoris (Austràlia)	144 (pell, faringe, anal, sang, orina)	PCR Cultiu	7 dies	Major CV a pell. Un total de 80/94 (85 %) cultius positius (Ct 16-36).
Paran et al. 2022 <sup>136</sup>	2022	32	Ambulatoris (Israel)	43 (faringe, pell, recte)	PCR Cultiu	-	Amb Ct $\geq 35$ els cultius eren negatius i indiquen no infectivitat del virus.
Lapa et al. 2022 <sup>137</sup>	2022	1	Ambulatoris (Itàlia)	33 (pell, plasma, orina, semen)	PCR Cultiu	19 dies	Semen PCR positiva fins a dia 19. Semen amb cultiu positiu a dia 6.
Colavita et al. 2023 <sup>138</sup>	2022	3	Ambulatoris (Itàlia)	138 (faringe, orina, plasma, semen, saliva, femta)	PCR Cultiu	19 dies	4/17 (23,5 %) cultius virals positius, essent 1/5 (20 %) positius de semen.

**Llegenda Taula 3.** CV: Càrrega Viral; RDC: República Democràtica del Congo.

Un estudi francès dut a terme durant el brot de 2022 (soca IIb) va incloure mostres de 50 pacients i de 24 pacients després de 14 dies de seguiment, i observaven una reducció evident de les mostres positives a dia 14, en comparació amb les mostres basals. Tot i així, l'estudi prenia mostres només en 2 moments de l'evolució de la infecció i en cap d'ells es realitzava cultiu viral.<sup>132</sup> Un altre estudi de 7 pacients hospitalitzats amb l'Mpox al Regne Unit mostrava una eliminació viral prolongada (22-39 dies) en diferents mostres (sang, orina, pell i faringe), però la principal limitació era la petita mida mostral, que els pacients tenien malaltia greu que va requerir ingrés hospitalari i tampoc no realitzaven cultius virals.<sup>96</sup> Un estudi de RDC de pacients infectats per la soca I mostrava CV més elevades a la pell que en altres localitzacions, i que el virus es podia detectar a la sang i a la faringe abans de l'aparició de l'exantema.<sup>133</sup> Cal tenir en compte que els pacients d'aquest estudi estaven infectats per la soca I i tampoc mostren dades de cultius virals. Un estudi català dut a terme també durant el brot de 2022 va incloure mostres de 12 pacients i observava que les mostres d'exsudat cutani tenien majors CV que en altres localitzacions; tot i així, la col·lecció de mostres s'havia dut a terme de forma irregular entre els dies 4-16 de la infecció i tampoc no hi havia informació sobre cultius virals.<sup>129</sup> Un estudi de 5 pacients ambulatoris amb l'Mpox a Nova Delhi mostrava una eliminació viral també prolongada fins a dia 24 des de l'inici dels símptomes, però seguia sent un estudi amb una petita mostra i sense correlacionar-ho amb cultius virals.<sup>131</sup> Un estudi amb 65 mostres de 16 pacients amb Mpox (5 ingressats i 11 ambulatoris) a Alemanya durant el brot de 2022 evidenciava que la major CV es trobava en lesions cutànies, que l'eliminació viral era prolongada (3 setmanes) i només 2 cultius virals de lesions cutànies van ser positius.<sup>134</sup> Tot i així, la col·lecció de mostres s'havia dut a terme de forma irregular i no s'havien realitzat cultius de tots els pacients. Un estudi australià que analitzava 144 mostres de 70 pacients amb Mpox avaluaven les CV de diferents mostres clíniques (pell, faringe, sang, orina i recte) i ho correlacionaven amb el creixement en cultius cel·lulars; observaven que la major CV era en les mostres d'exsudats cutanis i que en 80/94 (85 %) dels casos els cultius eren positius en diferents localitzacions i corresponien a CV amb Ct entre 16-36.<sup>135</sup> Un estudi amb 43 mostres d'Israel intentava correlacionar la CV amb la capacitat infectiva del virus i observaven que, amb Ct  $\geq 35$ , els cultius virals resultaven negatius i que probablement aquest valor es traduïa en una infectivitat nul·la.<sup>136</sup>

Per tal d'arribar a conclusions més sòlides sobre la dinàmica viral del MPXV calen estudis amb majors mides mostrals, amb preses de mostres de forma més regular i consistent, durant

períodes llargs de seguiments i amb dades de cultius virals de diferents mostres per correlacionar les CV amb la probable infectivitat del virus.

### Prevenció i control

Per tal de controlar el brot de 2022 amb el propòsit d'aturar l'epidèmia en diversos països interrompent la transmissió de persona a persona, protegint els grups vulnerables amb risc de patir una malaltia greu d'Mpox i minimitzant la transmissió zoonòtica del MPXV, les autoritats sanitàries van utilitzar diverses estratègies: la identificació i l'aïllament dels casos amb Mpox, el rastreig de contactes i la vacunació.

Com s'ha comentat, el nombre de casos d'Mpox fora de les àrees endèmiques havia estat molt limitat i, per tant, existien poques dades en el context europeu per tal d'orientar la presa de decisions sobre la durada de l'aïllament, un fet fonamental per a la gestió dels brots epidèmics. En absència de suficient evidència de qualitat, les mesures de prevenció i de control del brot de 2022 van consistir, en primer lloc, en l'aïllament respiratori dels pacients amb Mpox utilitzant mascareta quirúrgica i minimitzant el contacte amb altres persones, evitant també el contacte físic i les relacions sexuals fins que totes les crostes de les lesions cutànies haguessin caigut i la pell de sota hagués epitelitzat, cosa que podria tardar fins a 3 setmanes. També, en absència de dades sobre el risc de persistència del virus en el semen al llarg del temps, l'OMS va recomanar la utilització del preservatiu durant qualsevol relació sexual fins a 12 setmanes després de la infecció.<sup>139</sup> Són diversos els estudis que han detectat ADN del MPXV en semen<sup>112</sup> i alguns la seva positivitat en cultius virals.<sup>137,138</sup> Tot i així, no hi ha prou evidència disponible per afirmar la infecciositat del virus a través del semen. Cal tenir en compte que altres virus, quan causen virèmia, es poden trobar al semen ja que les barreres hematotesticulars permeten la circulació de virus a través d'aquestes. Tot i així, no hi ha evidència que tots els virus es puguin replicar dins l'aparell reproductor ni transmetre per via sexual.<sup>140</sup>

La segona mesura de control del brot de 2022 va consistir en fer el rastreig dels contactes. Davant de qualsevol cas, s'havia d'iniciar la cerca i identificació dels seus contactes estrets. Se'ls havia d'informar dels símptomes d'Mpox i calia que realitzessin un control de temperatura i símptomes fins a 21 dies després del darrer contacte amb el cas, reduint les interaccions socials i evitant les relacions sexuals amb altres persones.<sup>141,142</sup>

En tercer lloc, es va iniciar la vacunació d'aquelles persones no vacunades prèviament i que no haguessin passat la infecció. Històricament, s'ha demostrat que la vacunació contra la verola humana ofereix protecció creuada contra l'Mpox.<sup>143</sup> La vacuna utilitzada actualment és una vacuna de tercera generació que inclou una forma modificada de virus no replicant, que no pot provocar la malaltia. La pauta de vacunació és de dues dosis de vacuna separades per un mínim de 28 dies. En situacions d'escassetat en el nombre de dosis, se'n va autoritzar l'administració de forma fraccionada prioritzant l'administració subcutània (0,5ml) per a persones de risc i administrant la vacuna per via intradèrmica (0,1 ml) a la resta de població, beneficiant-se de la major reactogenicitat que proporciona la via intradèrmica en comparació amb la via subcutània. Actualment es recomana la vacunació preexposició en persones que mantenen pràctiques sexuals de risc i en aquelles amb risc ocupacional, i la vacunació postexposició als contactes estrets que no hagin passat la malaltia i a les persones amb risc de patir malaltia greu (persones menors de 18 anys, embarassades i immunodeprimits) dins dels 4 dies posteriors a l'exposició (i fins als 14 dies en cas d'absència de símptomes).<sup>144</sup>

### Justificació de l'estudi

El brot d'Mpox de l'any 2022 va representar un gran repte clínic i de salut pública. Per això cal entendre millor com es transmet el MPXV i com i quan s'elimina de cada localització corporal, per tal de prendre la millor decisió sobre la gestió del pacient. Això hauria de contribuir a adoptar millors directrius per al maneig dels casos, el seu aïllament i les precaucions que cal prendre després de la recuperació. Per tant, s'ha volgut caracteritzar la cinètica viral del MPXV al llarg del temps en diverses localitzacions corporals, combinant dades de qPCR, per calcular la CV, i de cultius virals, per avaluar la presència de virus replicants en les mostres recollides, i d'aquesta manera, avaluar la infecciositat del MPXV en cada localització corporal.

## Hipòtesis

En aquesta tesi es plantegen les següents hipòtesis en relació a la millora del cribratge, el diagnòstic, la prevenció i el tractament de les ITS ulceratives com la sífilis i l'Mpox.

### 1. Hipòtesi sobre la sífilis

L'eficàcia del linezolid oral (600 mg cada 24 hores durant 5 dies) no és inferior a la PGB intramuscular (2,4 MU, dosi única) per aconseguir la curació clínica, serològica i molecular de la sífilis precoç.

Aquesta hipòtesi serà abordada en el **primer article**.

### 2. Hipòtesis sobre l'Mpox

**2a)** L'automostreig és una estratègia fiable per a diagnosticar l'Mpox.

Aquesta hipòtesi serà abordada en el **segon article**.

**2b)** La CV del MPXV i el temps fins a l'eliminació del seu ADN són superiors en lesions cutànies comparat amb altres localitzacions corporals (recte, faringe, sang, secrecions vaginals/semen).

Aquesta hipòtesi serà abordada en el **tercer article**.



# Objectius

## Objectiu general

L'objectiu general d'aquesta tesi és la recerca de noves estratègies terapèutiques i diagnòstiques de dues ITS ulceratives de creixent incidència: la sífilis i l'Mpox. Aquest objectiu es pot desglossar en els següents objectius específics:

### 1. Objectius per a la sífilis

Objectiu principal: avaluar la no-inferioritat del tractament amb linezolid oral (600 mg cada 24 hores durant 5 dies) comparat amb el tractament estàndard amb PGB intramuscular (2,4 MUI, dosi única) per aconseguir la curació de la sífilis precoç.

Objectiu secundari: avaluar la seguretat del tractament amb linezolid oral (600 mg cada 24 hores durant 5 dies) en comparació amb el tractament estàndard amb PGB intramuscular (2,4 MUI, dosi única) per aconseguir la curació de la sífilis precoç.

### 2. Objectius per a l'Mpox

#### Objectius principals:

- Avaluar l'exactitud diagnòstica de les mostres autorecollides pels pacients en comparació amb les mostres recollides pels professionals sanitaris per a diagnosticar l'Mpox.
- Avaluar la dinàmica viral (CV i temps fins a l'eliminació de l'ADN) en diferents moments de la infecció i diverses localitzacions corporals: lesions cutànies, recte, faringe, semen/secrecions vaginals i sang.

#### Objectius secundaris:

- Comparar els valors Ct entre les mostres preses pels professionals sanitaris i les mostres autopreses pels pacients.
- Descriure la presència de virus amb capacitat de replicació a través de cultius virals en un subgrup de pacients (incloent-hi mostres de diferents localitzacions corporals i de diferents moments de la infecció).





# Material, mètodes i resultats

## Estudi 1

### **Oral linezolid compared with benzathine penicillin G for treatment of early syphilis in adults (Trep-AB Study) in Spain: a prospective, open-label, non-inferiority, randomised controlled trial**

M. Ubals, P. Nadal-Baron\*, M. Arando\*, Á. Rivero, A. Mendoza, V. Descalzo- Jorro, D. Ouchi, C. Pérez- Mañá, M. Álvarez, A. Alemany, Y. Hoyos-Mallecot, E. Nunley, N.A.P. Lieberman, A.L. Greninger, C. Galván-Casas, C. Suñer, C. G-Beiras, R. Paredes, Prof. A. Rodríguez-Gascón, A. Canut, Prof. V. García-Patos, Prof. M. Farré, M. Marks, L. Giacani, M. Vall-Mayans\*\* and O. Mitjà\*\*.

Lancet Infect Dis. Apr 2024; 24(4):404-416. Epub 8 Jan 2024.

**Factor d'Impacte 56,3/ Quartil 1.**

### **Resum:**

#### **Introducció**

El maneig de la sífilis, una infecció de transmissió sexual (ITS) amb una incidència en creixement, es veu desafiada per l'escassetat de penicil·lina, la manca de dades d'assaigs aleatoritzats, l'absència d'alternatives a la penicil·lina per a dones embarassades al·lèrgiques (diferents a la desensibilització), l'administració parenteral necessària per a la neurosífilis i la sífilis congènita, i la resistència als macròlids. S'ha demostrat que el linezolid és eficaç contra el *Treponema pallidum* (T.p.), l'agent causant de la sífilis, *in vitro* i en el model en conill. Assolint aquest nivell d'evidència preclínica, cal investigar la seva eficàcia en humans amb sífilis.

#### **Mètodes**

Hem realitzat un assaig aleatoritzat, multicèntric, obert, de no-inferioritat, per avaluar l'eficàcia del linezolid per tractar la sífilis precoç en comparació amb la penicil·lina G benzatina (PGB). Hem reclutat participants amb confirmació serològica o molecular de sífilis (primària, secundària o latent precoç) en tres clíniques d'ITS de Catalunya (Espanya). Els participants van

ser assignats aleatòriament 1:1, utilitzant una llista d'aleatorització per blocs generada per l'ordinador, amb 6 participants per bloc, a rebre linezolid oral (600 mg cada 24 hores durant 5 dies) o PGB intramuscular (dosi única de 2,4 MUI). Es van avaluar els signes i símptomes (setmanalment fins a la setmana 6 i a les setmanes 12, 24 i 48) i els títols sanguinis d'anticossos no-treponèmics (a les setmanes 12, 24 i 48). L'objectiu principal va ser la resposta al tractament, avaluada mitjançant un criteri compost que incloïa la curació clínica, la serològica i l'absència de recaiguda. La curació clínica es va avaluar a les 2 setmanes per a la sífilis primària i a les 6 setmanes per a la sífilis secundària després de l'inici del tractament. La curació serològica es va definir com una disminució de quatre vegades en el títol RPR o la seroreversió durant el seguiment (a les 12, 24 o 48 setmanes). L'absència de recaiguda es va definir com la presència de diferents tipus de seqüències moleculars de T.p. en l'episodi de sífilis recurrent. Es mostraria no-inferioritat si el límit inferior de l'interval de confiança del 95 % (IC95%) bilateral per a la diferència era superior al -10 %. L'anàlisi principal es va fer en la població per protocol. L'assaig està registrat a [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT05069974) i es va aturar per inutilitat del linezolid després d'una anàlisi intermèdia.

## **Resultats**

Entre el 20 d'octubre de 2021 i el 15 de setembre de 2022, 62 pacients van ser avaluats per a elegibilitat i 59 d'ells van ser aleatoritzats al grup linezolid (n = 29) o al grup PGB (n = 30). A la població per protocol, després de 48 setmanes de seguiment, 19 de 27 (70,4 %; IC95% 49,8 a 86,2) participants del grup linezolid havien respost al tractament i 28 de 28 (100 %; IC95% 87,7 a 100) en el grup PGB (diferència de tractament -29,6 %; IC95% -50,5 a -8,8), i no es complia el criteri de no-inferioritat establert. El nombre d'esdeveniments adversos relacionats amb els fàrmacs (tots lleus o moderats) va ser similar en ambdós grups de tractament (5 de 29 [17,2 %; IC95% 5,8 a 35,8] en el grup de linezolid vs. 5 de 30 [16,6 %; IC95% 5,6 a 34,7] en el grup PGB). No es van reportar esdeveniments adversos greus durant el seguiment.

## **Conclusió**

L'eficàcia del linezolid a una dosi diària de 600 mg durant 5 dies no va complir el criteri de no-inferioritat en comparació amb la PGB i, per tant, aquest règim de tractament no s'ha d'utilitzar per tractar pacients amb sífilis precoç.



# Oral linezolid compared with benzathine penicillin G for treatment of early syphilis in adults (Trep-AB Study) in Spain: a prospective, open-label, non-inferiority, randomised controlled trial



Maria Ubals, Patricia Nadal-Baron\*, Maider Arando\*, Ángel Rivero, Adrià Mendoza, Vicent Descalzo Jorro, Dan Ouchi, Clara Pérez-Mañá, Marlene Álvarez, Andrea Alemany, Yannick Hoyos-Mallecot, Ethan Nunley, Nicole A P Lieberman, Alexander L Greninger, Cristina Galván-Casas, Clara Suñer, Camila G-Beiras, Roger Paredes, Alicia Rodríguez-Gascón, Andrés Canut, Vicente García-Patos, Magí Farré, Michael Marks, Lorenzo Giacani, Martí Vall-Mayans†, Oriol Mitjà†

## Summary

*Lancet Infect Dis* 2024;  
24: 404–16  
Published Online  
January 8, 2024  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00683-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00683-7)  
See [Comment](#) page 335

\*Contributed equally

†Contributed equally

Skin Neglected Tropical Diseases and Sexually Transmitted Infections Section (M Ubals MD, A Mendoza MD, A Alemany MD, C Suñer PhD, C G-Beiras PhD, M Vall-Mayans PhD, O Mitjà PhD), Fundació Lluita Contra les Infeccions (Á Rivero MD, A Mendoza, D Ouchi MSc, C Galván-Casas PhD, C Suñer, R Paredes PhD, O Mitjà), Clinical Pharmacology Department (C Pérez-Mañá PhD, Prof M Farré PhD), Pharmacy Department (M Álvarez PhD), Department of Infectious Diseases (R Paredes), and IrsiCaixa AIDS Research Institute (R Paredes), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Facultat de Medicina, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain (M Ubals, P Nadal-Baron MSc); Dermatology Department (M Ubals, Prof V García-Patos PhD), Microbiology Department (P Nadal-Baron, Y Hoyos-Mallecot PhD), and Infectious Diseases Department (M Arando PhD, V Descalzo Jorro MD), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; Barcelona Checkpoint, Projecte dels NOMS, Hispanosida, Barcelona (Á Rivero); Department of Medicine, Division of Allergy and Infectious Diseases and

**Background** Management of syphilis, a sexually transmitted infection (STI) with increasing incidence, is challenged by drug shortages, scarcity of randomised trial data, an absence of non-penicillin alternatives for pregnant women with penicillin allergy (other than desensitisation), extended parenteral administration for neurosyphilis and congenital syphilis, and macrolide resistance. Linezolid was shown to be active against *Treponema pallidum*, the causative agent of syphilis, in vitro and in the rabbit model. We aimed to assess the efficacy of linezolid for treating early syphilis in adults compared with the standard of care benzathine penicillin G (BPG).

**Methods** We did a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised controlled trial to assess the efficacy of linezolid for treating early syphilis compared with BPG. We recruited participants with serological or molecular confirmation of syphilis (either primary, secondary, or early latent) at one STI unit in a public hospital and two STI community clinics in Catalonia (Spain). Participants were randomly allocated in a 1:1 ratio using a computer-generated block randomisation list with six participants per block, to receive either oral linezolid (600 mg once per day for 5 days) or intramuscular BPG (single dose of 2·4 million international units) and were assessed for signs and symptoms (once per week until week 6 and at week 12, week 24, and week 48) and reagin titres of non-treponemal antibodies (week 12, week 24, and week 48). The primary endpoint was treatment response, assessed using a composite endpoint that included clinical response, serological response, and absence of relapse. Clinical response was assessed at 2 weeks for primary syphilis and at 6 weeks for secondary syphilis following treatment initiation. Serological cure was defined as a four-fold decline in rapid plasma reagin titre or seroreversion at any of the 12-week, 24-week, or 48-week timepoints. The absence of relapse was defined as the presence of different molecular sequence types of *T pallidum* in recurrent syphilis. Non-inferiority was shown if the lower limit of the two-sided 95% CI for the difference in rates of treatment response was higher than –10%. The primary analysis was done in the per-protocol population. The trial is registered at ClinicalTrials.gov (NCT05069974) and was stopped for futility after interim analysis.

**Findings** Between Oct 20, 2021, and Sept 15, 2022, 62 patients were assessed for eligibility, and 59 were randomly assigned to linezolid (n=29) or BPG (n=30). In the per-protocol population, after 48 weeks' follow-up, 19 (70%) of 27 participants (95% CI 49·8 to 86·2) in the linezolid group had responded to treatment and 28 (100%) of 28 participants (87·7 to 100·0) in the BPG group (treatment difference –29·6, 95% CI –50·5 to –8·8), which did not meet the non-inferiority criterion. The number of drug-related adverse events (all mild or moderate) was similar in both treatment groups (five [17%] of 29, 95% CI 5·8 to 35·8 in the linezolid group vs five [17%] of 30, 5·6 to 34·7, in the BPG group). No serious adverse events were reported during follow-up.

**Interpretation** The efficacy of linezolid at a daily dose of 600 mg for 5 days did not meet the non-inferiority criteria compared with BPG and, as a result, this treatment regimen should not be used to treat patients with early syphilis.

**Funding** European Research Council and Fondo de Investigaciones Sanitarias.

**Copyright** © 2024 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an Open Access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license.

## Introduction

Syphilis is a sexually transmitted infection (STI) caused by *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* that affects

more than 50 million people worldwide. The incidence of syphilis has increased markedly in Europe and high-income countries since 2000, with the highest rise

## Research in context

### Evidence before this study

On July 1, 2023, we searched PubMed from inception for articles containing the terms “randomized controlled trial” or “phase III” and either “syphilis” or “*T pallidum*” in the title or abstract. Our search retrieved 61 results since 1987, most of which investigated the effectiveness of screening strategies and other public health interventions. We found five trials investigating the efficacy of azithromycin, ceftriaxone, and enhanced regimens of benzathine penicillin G (BPG), one pilot randomised controlled trial (RCT) on cefixime, one pilot RCT on amoxicillin (with or without probenecid), and observational studies on doxycycline. Early trials had demonstrated the efficacy of azithromycin, but a high prevalence of macrolide resistance (ranging from 67% to 100%) was reported in specimens from several studies globally between 2004 and 2020. Ceftriaxone showed efficacy similar to BPG in early syphilis, with limited evidence in neurosyphilis, but required a prolonged course of intramuscular or intravenous administrations. Preliminary studies investigating 10-day treatment with cefixime showed positive results, but no phase 3 trials have confirmed efficacy. Non-randomised observational studies on doxycycline suggested the effectiveness of this drug against syphilis, but evidence on neurosyphilis remains scarce. We found no studies investigating the clinical efficacy of linezolid (or any other oxazolidinone) for treating syphilis.

### Added value of this study

Our study is one of the few RCTs investigating syphilis in the past two decades, and marks a pioneering milestone because, to the best of our knowledge, it is the first RCT to assess clinical efficacy of agents that are not  $\beta$ -lactams or macrolides in the treatment of syphilis. We used state-of-the-art molecular

technology to define cure endpoints allowing differentiation of reinfection (with a different *T pallidum* type) and relapse (with the same type). This approach is clinically relevant because the relapse of the same infection suggests that the treatment might not have completely cured the initial infection of the individual. By contrast, reinfection can occur even when the treatment has successfully cured the initial infection, but the patient is re-exposed to the pathogen. Our approach can serve as a new model for future trials on syphilis, setting a higher standard for research in this field. We provide the first in-vivo RCT data on the efficacy of linezolid in treating early syphilis. Linezolid, an oxazolidinone with high tissue penetration, had previously shown activity against *T pallidum* in vitro and in the rabbit model. In the current trial, treatment with 600 mg of linezolid once per day resulted in a cure rate of 70% among patients with early syphilis and did not meet the pre-established non-inferiority criteria for efficacy when compared with the 100% cure rate with BPG. In our trial, at least three patients had relapses confirmed via molecular testing.

### Implications of all the available evidence

Current evidence consistently highlights the need for including new antibiotics in the therapeutic repertoire of syphilis, particularly for neurosyphilis, neonatal syphilis, and syphilis in pregnant women. Preclinical in-vitro evidence and evidence in the rabbit model support the use of linezolid as a therapeutic agent for *T pallidum* infections. However, our trial in non-pregnant adults with early syphilis was discontinued early because the observed results with linezolid at a dose of 600 mg per day for 5 days were not non-inferior to BPG, indicating that this regimen should not be considered for the treatment of early syphilis. A longer and higher dose regimen (eg, linezolid 600 mg twice per day for 10 days) should be explored.

observed among men who have sex with men.<sup>1</sup> Systemic dissemination of *T pallidum* can lead to neurosyphilis through invasion of the CNS, whereas in pregnant women, mother-to-child transmission can cause fetal loss, stillbirth, and congenital infection in newborns resulting in long term sequelae.<sup>2,3</sup>

The first-line therapy for early syphilis remains penicillin administered intramuscularly as a single dose of benzathine penicillin G (BPG),<sup>4</sup> whereas the recommended treatment of neurosyphilis, ocular syphilis, otosyphilis, and congenital syphilis<sup>4</sup> is aqueous crystalline penicillin (intravenously every 4 h) or procaine penicillin G (intramuscularly once per day) for 10–14 days. The current management of syphilis has several notable challenges. First, BPG supply has been hampered by periodic and prolonged shortages in numerous countries, including high-income, low-income, and middle-income countries.<sup>5–7</sup> According to a survey by WHO in 2015, the inability to treat pregnant women during the period of shortages contributed to more than half a million

estimated congenital syphilis cases.<sup>5,8</sup> Second, penicillin allergy is reported by 5–10% of pregnant people,<sup>9</sup> and the alternative treatment option, doxycycline, cannot be given during pregnancy because of potential teratogenicity. Therefore, penicillin desensitisation is required in this context.<sup>4,10</sup> Finally, treating neurosyphilis<sup>4,10</sup> and congenital syphilis<sup>3</sup> requires a lengthy intensive intravenous course, which can be stressful for patients, resulting in high bed occupancy and costly hospital admission, which can result in poor adherence, and which might be unfeasible, particularly in low-resource settings.

Few antibiotics have been evaluated in randomised controlled trials (RCTs) for the treatment of early syphilis.<sup>11</sup> Azithromycin was shown to be effective in two RCTs<sup>12,13</sup> but is no longer a suitable treatment for syphilis because of the high prevalence of resistant strains.<sup>14–16</sup> Ceftriaxone has shown efficacy in clinical trials of early syphilis,<sup>17</sup> but the antibiotic requires intramuscular or intravenous administration once per day for 10 days and

Department of Global Health, University of Washington, Seattle, WA, USA (L Giacani PhD); Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington Medical Center, Seattle, WA, USA (E Nunley BS, N A P Lieberman PhD, A L Greninger MD PhD); Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA (A L Greninger); Hospital Universitario de Mostoles, Madrid, Spain (C Galván-Casas); CIBERINFEC, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (R Paredes); Center for Global Health and Diseases, Department of Pathology, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH, USA (R Paredes); Pharmacokinetic, Nanotechnology, and Gene Therapy Group (PharmaNanoGene), Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, Spain (Prof A Rodríguez-Gascón PhD); Bioaraba, Microbiology, Infectious Disease, Antimicrobial Agents, and Gene Therapy Group, Vitoria-Gasteiz, Spain (Prof A Rodríguez-Gascón, A Canut MD); Microbiology Service, Araba University Hospital, Osakidetza Basque Health Service, Vitoria-Gasteiz, Spain (A Canut); Clinical Research Department, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK (M Marks PhD); Hospital for Tropical Diseases, London, UK (M Marks); Division of Infection and Immunity, University College London, London, UK (M Marks)

Correspondence to: Dr Oriol Mitjà, Skin Neglected Tropical Diseases and Sexually Transmitted Infections Section, Fundació Lluita Contra les Infeccions, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona 08917, Spain [omitja@lluïta.org](mailto:omitja@lluïta.org)

has not demonstrated robust efficacy in treating neurosyphilis.<sup>18</sup> Pilot studies on oral amoxicillin (with or without probenecid)<sup>19</sup> and cefixime<sup>20,21</sup> have been done, but conclusive results with larger sample sizes and broader populations are pending, and achieving sufficient concentrations of oral  $\beta$ -lactams in the CNS seems uncertain. Doxycycline appears to be as effective as BPG for early syphilis in observational studies, showing good results in people living with HIV,<sup>22,23</sup> and is recommended as a second-line option for early syphilis, but data are very scarce for neurosyphilis.<sup>24</sup> All of these challenges highlight the need for expanding the therapeutic repertoire available for the treatment of syphilis.<sup>4</sup>

An in-vitro model for culturing *T pallidum* was established in 2018 and paved the way for exploring the anti-treponemal activity of various antibiotic families and potentially repurposing compounds for syphilis treatment.<sup>25</sup> Several antibiotics have now been demonstrated to have activity in the in-vitro model.<sup>26,27</sup> Notably, linezolid (a patent-free, low-cost oxazolidinone) exhibited bactericidal activity at concentrations achievable at the site of infection using currently approved regimens,<sup>26,27</sup> and was demonstrated to successfully cure syphilis in the rabbit model.<sup>26</sup> Moreover, linezolid has the potential to treat systemic infections, including those affecting the CNS because of its high blood–brain barrier penetration and excellent oral bioavailability. The characteristics of linezolid could enable a fully oral treatment course for adult patients with neurosyphilis. We assessed the efficacy of linezolid for treating early syphilis in adults compared with the standard of care BPG.

## Methods

### Study design and participants

We did a multicentre, prospective, open-label, non-inferiority, RCT (The Trep-AB Study) at one STI unit in a public hospital and two STI community clinics in Catalonia (northeast Spain). Two of the three recruiting centres primarily serve men who have sex with men and transgender women, whereas the other centre serves both genders, albeit with a higher male attendance. This is because in Spain, sexual and reproductive health care for women is typically managed by gynaecologists, rather than STI clinics. All patients diagnosed with early syphilis were assessed for possible inclusion in the study. Eligible patients were adult individuals aged 18 years or older who met the International Union Against STIs Treatment Guidelines criteria for primary, secondary, or early-latent syphilis (full list available in the appendix p 2).<sup>4</sup> Primary and secondary syphilis typically have distinct clinical features; however, in instances in which patients exhibited both primary and secondary syphilis symptoms concurrently, they were categorised as having secondary syphilis. Participants with primary syphilis and a positive quantitative PCR (qPCR) test for *T pallidum* were

included, regardless of their baseline serological test results for syphilis. Participants with secondary and early-latent syphilis with positive results on both treponemal and non-treponemal serological tests were also included in the study, regardless of their qPCR result. The main exclusion criteria were a known allergy to investigational medicinal products, patients who met diagnostic criteria for symptomatic neurosyphilis, concurrent use of drugs with potential interactions, previous treatment for early syphilis within the past 6 months, antibiotic treatment potentially active against *T pallidum* in the past week (ie,  $\beta$ -lactams, macrolides, or tetracyclines), pregnancy, and concomitant symptomatic STIs. The complete list of selection criteria is provided in the appendix (p 2).

The study protocol was approved by the ethics committee of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain; registration number AC-21-016-HGT-CEIM) and by the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (Madrid, Spain; registration number EudraCT 2020-005604-19). Ethical evaluations were also done by the European Research Council Ethical Board (Brussels, Belgium; registration number 850450, Trep-AB). All participants provided written informed consent before enrolment. The study was done according to the principles for medical research involving human participants of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and Good Clinical Practice guidelines (ICH E6). All data generated in this trial were handled according to the General Data Protection Regulation 2016/679 on data protection and privacy for all individuals within the EU. The trial is registered at ClinicalTrials.gov (NCT05069974).

### Randomisation and masking

Randomisation was done in a 1:1 ratio using a computer-generated block-randomisation list with six participants per block without stratification by recruiting centre. Allocation was concealed from investigators using the study electronic case report form in REDCap, which revealed the allocation after the study investigator had decided to enrol a patient. Laboratory technicians and statisticians were unaware of the treatment allocation and treatment response of the participant throughout the study. Masking the treatment allocation from patients was not possible because of the different dosing, treatment duration, and administration routes of the investigational products. Participants randomly assigned to the intervention group received linezolid, administered orally at a dose of 600 mg once per day for 5 days. Participants randomly assigned to the control group received BPG, administered intramuscularly as a single dose of 2.4 million international units (MIU).

### Procedures

Linezolid is a well known antimicrobial approved for the treatment of susceptible Gram-positive infections at a

See Online for appendix

standard dose of 600 mg per 12 h for 10–14 days.<sup>28</sup> Moreover, linezolid 600 mg per 24 h has been used off label to treat multidrug-resistant tuberculosis.<sup>29</sup> We adopted a drug-repurposing strategy for our clinical trial. The selected dose and frequency of linezolid (600 mg per 24 h) was determined through simulations of drug concentrations over the dosing period, on the basis of an area under the concentration-time curve for the free drug over a 24 h period (fAUC<sub>24h</sub>) of 64·0 µg·h/mL, and a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0·5 mg/L.<sup>26,28</sup> The pharmacokinetic–pharmacodynamic target was the fAUC<sub>24h</sub>:MIC ratio of at least 100, which has been shown to predict clinical efficacy for other bacterial infections.<sup>30</sup> In our simulations (appendix p 3), linezolid concentrations reached a fAUC<sub>24h</sub>:MIC ratio of 128·0, exceeding 100.

The selected treatment duration of 5 days was based on the concept that a cure for the infection can be achieved if drug treponemicidal concentrations are maintained for at least 5–7 days.<sup>31,32</sup> In the original experiments by Eagle and colleagues,<sup>31,32</sup> *T pallidum* was cleared from chancres if penicillin concentrations were maintained over a 2–3-day period; however prolonged exposure for a period of 5–7 days was felt to be required to clear treponemes that might persist in the lymph nodes and tissues because of the slow-growing nature of the bacteria (generation time 30–33 h).<sup>33,34</sup> The optimal duration of treatment for early syphilis is still unknown and has not been assessed in clinical trials.

A single daily dose for 5 days was chosen as a balance between efficacy and convenience, recognising the relationship between dosing simplicity and adherence in various medical conditions.<sup>35,36</sup> This decision prioritised enhancing real-world treatment outcomes, especially in low-income and middle-income countries with poor access to health-care facilities, which might result in challenges regarding treatment compliance.

To warrant patient safety, our patient-monitoring approach involved the following: frequent checks for rapid identification of treatment failure and subsequent application of standard-of-care treatment and follow-up until complete cure; a follow-up period of sufficient duration (ie, 48 weeks, later extended to 96 weeks) to detect relapse in any enrolled patient; an interim analysis with a relatively small sample size of 50 patients; and rigorous oversight by the Clinical Trial Unit and Contract Research Organisation of the Fight Infectious Disease Foundation.

Both investigational medicinal products are marketed drugs and were supplied by the study sponsor. Linezolid was packaged with instructions inserted by the pharmacy service of the University Hospital Germans Trias i Pujol.

At baseline, we collected data on demographic, epidemiological, and clinical characteristics, including concomitant medications or recreational drug use. Participants underwent physical examination and a clinical assessment of syphilis, including a specific

assessment for neurosyphilis conducted according to routine clinical practice (appendix p 3). Laboratory assessments included serological tests for syphilis (chemiluminescence immunoassay and rapid plasma reagin [RPR]), and qPCR testing of swab samples and plasma. Swabs were collected from chancres in primary syphilis and oral or genital mucosal lesions in secondary syphilis (lesional swabs). For latent syphilis and secondary syphilis without mucosal lesions, swabs were taken from healthy oral mucosa (oral swabs). Participants allocated to the control group received an intramuscular injection of BPG, and those in the intervention group were provided with the necessary doses of linezolid and instructed to take a tablet every 24 h starting at the point of care.

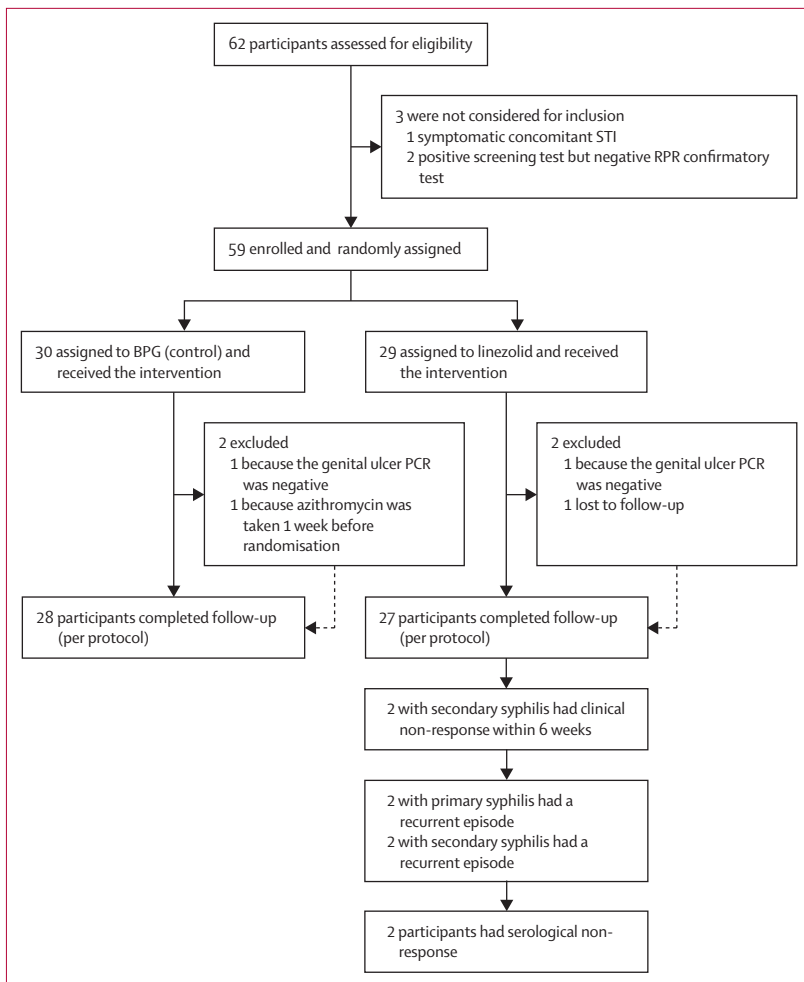
All participants were interviewed by telephone 1 week after treatment start to assess adverse events related to the medication and treatment compliance. Subsequently, they were interviewed once per week until week 6 to monitor other safety outcomes, clinical outcomes, and concomitant medication. On-site follow-up visits were scheduled at week 12, week 24, and week 48 (study end) and included a repeat interview and physical examination and serological tests for syphilis to assess serological cure.

Additional in-person visits were scheduled at any time during the follow-up for patients who experienced clinical non-response or worsening of lesions within 6 weeks of treatment initiation and those with clinical recurrence at any time during follow-up, or serological non-response or rebound. During this visit, epidemiological and clinical information was gathered, and a comprehensive physical examination was conducted, including an assessment for neurosyphilis. Serology samples were obtained along with lesional swabs or oral swabs.

Participants who did not achieve clinical or serological cure, or experienced recurrence, were treated with a single dose of BPG 2·4 MIU<sup>3</sup> and were followed up until they reached complete cure. A 96-week long-term monitoring plan for all participants, including those who achieved clinical and serological cure, is currently in place to detect and track potential relapse.

For PCR identification of *T pallidum* DNA in swabs, DNA extraction was done using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on 300 µL samples and eluted in 100 µL of RNase-free water (appendix p 4). Total DNA quantification was done using Thermo Scientific NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). *T pallidum* DNA detection was done using an in-house qPCR assay targeting the *tpp47* gene (*tp0574*).

To analyse genetic profiles of *T pallidum*, multilocus sequence typing (MLST) and whole-genome sequencing (WGS) were performed. MLST analysis involved PCR amplification of a partial region of the *tp0136*, *tp0548*, and *tp0705* genes, followed by Sanger sequencing.<sup>37</sup> Sequence analysis was done using MEGA software version 11.0.13. The Total Diversity Index was calculated as the ratio of



**Figure 1: Trial profile**

An interim futility analysis was done when 50 participants reached the 24-week follow-up. During this 24-week follow-up period, we enrolled an additional 12 participants before conducting the interim analysis, after which we halted further enrolment. BPG=benzathine penicillin G. ITT=intention to treat. RPR=rapid plasma reagin. STI=sexually transmitted infection.

different sequences to fully typable samples. WGS was done in samples with a *tp0574* qPCR cycle threshold value lower than 31 cycles. Precapture libraries were prepared using the Kapa Hyperplus Kit (Roche, Hague, IN, USA) with 8 min of fragmentation. Capture was done using Integrated DNA Technologies xGen Hybridization Capture protocol, using biotin-labelled capture probes designed on the basis of the *T pallidum* SS14 (accession number nucleotide NC\_010741) genome. Sequencing was done on the NextSeq 2000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA). Bioinformatic analysis, including MLST and resistance screening, was done using established pipelines at the University of Washington, Washington, DC, USA, laboratory.<sup>38</sup> Raw sequencing reads and consensus genome sequences were deposited in the National Center for Biotechnology Information database (Bioproject PRJNA723099). The phylogenetic tree was constructed from whole-genome

sequences masked at repetitive loci<sup>39</sup> and aligned with MAFFT version 7.471 (reference PMC3603318), using the neighbor-joining method in the Geneious Prime software, version 2020.1.2.

## Outcomes

The primary efficacy endpoint was treatment response, assessed using a composite endpoint that included clinical cure, serological cure, and absence of relapse. To meet the definition of cure the participant had to meet all three components of the primary endpoint. Clinical cure was defined as the healing of primary syphilis lesions within 2 weeks and secondary syphilis lesions within 6 weeks from treatment start (ie, the manifestations of primary and secondary syphilis differ in healing time frames).<sup>40</sup> For patients with latent syphilis, clinical cure was not assessed since there are no visible lesions in this stage of the disease. Serological cure was determined by a four-fold decline in RPR titre or seroreversion at any of the prespecified timepoints (12 weeks, 24 weeks, and 48 weeks) from treatment initiation. In patients with primary syphilis and negative serology at baseline, serological response was not assessed. In people presenting with clinical recurrence, MLST and WGS of *T pallidum* were used to differentiate between relapse (persistent infection with the same strain) and reinfection (infection with a new strain). This is clinically relevant as a relapse is indicative of treatment failure, whereas reinfection can occur even after treatment success when the patient is re-exposed to the pathogen. Cases of clinical recurrence in which MLST and WGS could not provide results (ie, untypeable strains caused by low DNA quantity in the swab) were considered a relapse for the primary endpoint analysis. Sensitivity analyses were done treating people with untypeable cases as if they did not represent a relapse.

Secondary endpoints were the individual components of the primary endpoint, comprising clinical cure, serological cure, and absence of relapse. Additionally, a post-hoc endpoint of reinfection was assessed on the basis of serological rebound during follow-up, defined as a four-fold increase in titres in previously serologically cured participants.

## Statistical analysis

This study was based on the assumption that linezolid would be non-inferior to BPG for the primary efficacy outcome, with use of a prespecified non-inferiority margin; the lower limit of the 95% CI for the difference in treatment response between groups would not exceed -10%. We calculated that a sample size of 150 participants would give a power of 80% to test the hypothesis on the basis of an anticipated response rate of 95% in each treatment group and a one-sided type-1 error rate of 0.025. An interim futility analysis was planned once 50 participants reached the 24-week follow-up. The stopping rule entailed using the  $\beta$ -spending function

method approximating the O'Brien-Fleming non-binding boundaries. If the one-sided p value observed at the interim analysis for non-inferiority was higher than 0.473, the trial would be stopped for futility.

We selected the per-protocol population for the primary analysis. This population included all eligible patients who underwent random assignment and who completed the study procedures to week 48. We also did supporting analysis with the intention-to-treat population, which included all eligible patients, and in which patients with missing data were regarded as having treatment failure.

For the analysis of the primary endpoint (cure rate at 48 weeks) we estimated two-sided 95% CIs for the difference in cure proportions between the linezolid and the BPG using the likelihood score test. We used the same method to analyse secondary binary endpoints. To compare adverse events between treatment groups we used two-sided *t* tests and Fisher's exact test with a significance level of 0.05. We did all statistical analyses with R, version 4.2.1.

Following the discontinuation of the trial, we did a post-hoc pharmacokinetic–pharmacodynamic analysis and Monte Carlo simulation to assess the probability of target attainment with various linezolid dosage regimens. The probability of target attainment represents the percentage of patients in which the pharmacokinetic–pharmacodynamic index reaches the value associated with clinical efficacy (ratio fAUC<sub>24</sub>:MIC  $\geq$ 100 in the case of linezolid).<sup>30,41</sup> For the simulations, we extracted the pharmacokinetic parameters of linezolid and the MIC value for *T pallidum* from the literature.<sup>26,28,42</sup> Details on the methodology of the simulation are provided in the appendix (p 10).

### Role of the funding source

The funders of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

### Results

Enrolment was halted early at the prespecified interim analysis because of the futility of linezolid ( $p=0.99$  using the  $\beta$ -spending function method, exceeding the predefined 0.473 threshold). Between Oct 20, 2021, and Sept 15, 2023, 62 patients had been assessed with suspected early syphilis for eligibility (figure 1). Three patients were not enrolled because they did not meet the selection criteria. 59 patients with serologically or molecular-confirmed syphilis were randomly assigned to receive either linezolid ( $n=29$ ) or BPG ( $n=30$ ; intention-to-treat population). Demographic characteristics and past medical history of participants in both treatment groups were similar (table 1). The mean age of participants was 37.6 years (SD 9.5) in the linezolid group and 39.2 years (9.9) in the BPG group, and all participants were men (all cisgender). Baseline characteristics of the syphilis episode and laboratory results were also similar

	Linezolid (n=29)	BPG (n=30)
Age, years	37.6 (9.5)	39.2 (9.9)
Gender		
Men*	29 (100%)	30 (100%)
Women	0	0
Region of origin		
Spain	19 (66%)	17 (57%)
Latin America	3 (10%)	10 (33%)
Other regions	7 (24%)	2 (7%)
Data not available	0	1 (3%)
Sexual contacts in the past 12 months	20 (10–40)	10 (4–35)
PrEP for HIV prevention in the past 12 months	13 (44.8)	5 (16.6)
Substance use in the past 2 weeks†	7 (24.1)	8 (26.7)
STI in the past 12 months‡	26 (89.7)	25 (83.3)
Syphilis history		
Past syphilis episodes	19 (65.5)	18 (60.0)
Years since last episode	2 (1–3)	3 (1–5)
Number of episodes (n=37)		
1	8 (42.1)	12 (66.7)
2	9 (47.4)	4 (22.2)
3	2 (10.5)	1 (5.6)
4	0 (0.0)	1 (5.6)

Data are presented as n (%), mean (SD), or median (IQR). BPG=benzathine penicillin G. PrEP=HIV pre-exposure prophylaxis. STI=sexually transmitted infection. \*All cisgender. †The complete list of substances is provided in the appendix (p 5). Numbers provided exclude alcohol consumption. ‡The complete list of previous STIs is provided in appendix p 5.

**Table 1: Demographic characteristics and past history of study participants (intention-to-treat population)**

in both treatment groups (table 2). Among the 59 patients, nine (31%) of 29 participants in the linezolid group and nine (30%) of 30 in the BPG group had primary syphilis, nine (31%) of 29 participants in the linezolid group and ten (33%) of 30 in the BPG group had secondary syphilis, and 11 (38%) of 29 participants in the linezolid group and 11 (37%) of 30 in the BPG group had early-latent syphilis. Among 18 patients with primary syphilis, ten (56%) had a negative RPR result, suggesting a window period before seroconversion.

Of 59 patients, 28 (47%) tested positive for *T pallidum* qPCR in swab specimens (16 [89%] of 18 with primary syphilis, 11 [58%] of 19 with secondary syphilis, and one [5%] of 22 with latent syphilis), whereas 31 (53%) of 59 tested negative, which is common in secondary and latent stages (table 2). The mean cycle threshold value in swab specimens was 31.3 (SD 3.4), with 12 (43%) specimens having a value below 31 cycles. In plasma specimens, 16 (27%) of 59 participants tested positive for *T pallidum* qPCR (two [11%] of 18 with primary syphilis, 12 [67%] of 19 with secondary syphilis, and two [11%] of 22 with early-latent syphilis). Five participants who tested negative in their swab specimen had a positive result in their blood specimen.



	Linezolid (n=29)	BPG (n=30)
<b>Clinical characteristics</b>		
Syphilis stage		
Primary syphilis	9 (31%)	9 (30%)
Secondary syphilis	9 (31%)	10 (33%)
Early-latent syphilis	11 (38%)	11 (37%)
Symptoms duration (from symptom onset until baseline study visit)	5.00 (3.0–10.0)	14.0 (9.0–34.5)
Clinical manifestations of primary syphilis		
Chancere presence	9 (31%)	7 (23%)
Follmann balanitis	2 (7%)	1 (3%)
Clinical manifestations of secondary syphilis		
Generalised rash	4 (14%)	8 (27%)
Genital rash	5 (17%)	3 (10%)
Palms–soles involvement	1 (3%)	2 (7%)
Patchy hair loss	0	1 (3%)
Depapillated tongue	0	2 (7%)
Mucous plaques	1 (3%)	2 (7%)
Arthromyalgia	1 (3%)	3 (10%)
Adenopathy	1 (3%)	1 (3%)
Number of distinct secondary syphilis manifestations	1.00 (1.00–2.00)	1.50 (1.00–4.00)
<b>Laboratory results</b>		
RPR positive	24 (83%)	25 (83%)
Median RPR at enrolment	1/16	1/16
PCR positive		
PCR positive swabs	15/29 (52%)	13/30 (43%)
PCR Ct value	30.8 (3.6)	31.5 (3.2)
PCR positive lesional swabs	11/12 (92%)	9/10 (90%)
PCR positive healthy oral mucosa	4/17 (24%)	4/20 (20%)
PCR positive plasma	7/29 (24%)	9/30 (30%)
PCR Ct value	32.4 (2.0)	32.7 (2.3)
Participants with a PCR positive result (swab or plasma) by stage*		
Primary syphilis†	8/9 (89%)	8/9 (89%)
Secondary syphilis‡	7/9 (78%)	8/10 (80%)
Early-latent syphilis§	1/11 (9%)	1/11 (9%)
Specimen molecular characteristics in participants with positive swab or plasma results		
Clade		
Nichols	12/16 (75%)	4/17 (24%)
SS14	4/16 (25%)	8/17 (47%)
Unsuccessful clade identification	0/16	5/17 (29%)

(Table 2 continues in next column)

MLST typing was done in 33 participants with PCR positive swab or plasma samples. Full MLST typing was achieved in 25 (76%) of the 33 participants, and partial MLST typing was achieved in three (9%). Among the 28 fully or partially typed samples, 16 (57%) belonged to the Nichols-like clonal complex and 12 (43%) to the SS14-like clonal complex.<sup>43</sup> A total of five distinct allelic profiles were identified, yielding a Total Diversity Index value of 0.20, indicating low diversity. The most common allelic

	Linezolid (n=29)	BPG (n=30)
(Continued from previous column)		
MLST type¶		
1.1.1 (ST2)	0/16	1/17 (6%)
1.3.1 (ST1)	3/16 (19%)	5/17 (29%)
3.2.3 (ST6)	4/16 (25%)	0/17
9.7.3 (ST26)	7/16 (44%)	4/17 (24%)
1.17.9 (ST28)	1/16 (6%)	0/17 (0%)
1.X.1	0/16	2/17 (12%)
3.2.X	1/16 (6%)	0/17
Unsuccessful MLST type identification	0/16	5/17 (29%)
Concomitants asymptomatic STIs at baseline		
HIV positive test results	0/17	1/17 (6%)
Gonorrhoea test positive	0/19	2/23 (9%)
Chlamydia test positive	2/19 (11%)	3/23 (13%)
Other STIs	0/19	1/23 (4%)

Data are presented as n (%), mean (SD), or median (IQR). BPG=benzathine penicillin G. MLST=multilocus sequence typing. RPR=rapid plasma reagin. ST=sequence types of *Treponema pallidum*. STI=sexually transmitted infection. \*Specimens from 59 patients were collected at baseline, overall including 18 patients with primary syphilis, 19 patients with secondary syphilis, and 22 patients with latent syphilis. †Of the 18 specimens collected from patients with primary syphilis, all were genital ulcer swabs. Of these, 16 (89%) of 18 were positive, whereas two negative cases were excluded from the per-protocol population because they did not pass the screening. Plasma was quantitative PCR positive in two (12%) of the 16 cases. ‡Among the 19 specimens from patients with secondary syphilis, 15 were healthy oral swabs (7 [47%] qPCR positive), three were swabs from a genital lesion (three [100%] qPCR positive), and one was from an anal lesion swab (one [100%] qPCR positive). Additionally, plasma was positive for 12 (63%) of 19 patients, including four patients who tested negative with a swab. §One patient with latent syphilis had positive results in both plasma and healthy oral mucosa swabs and another patient was positive in plasma only (two [9%] of 22 positive plasma samples and one [5%] of 22 positive healthy oral mucosa). ¶Full MLST typing was reached in 25 (76%) of 33 patients with at least one PCR-positive specimen (either swab or plasma) and partial typing in three (9%) of 33. In patients with primary syphilis, typing was reached in 14 (78%) cases. In secondary syphilis, full or partial typing was reached in 13 patients; seven (47%) of 15 oral swabs, four (100%) of four lesion swabs, and nine (47%) of 19 plasma specimens were typed. In early-latent syphilis, one (5%) of 22 oral swabs was typable and no typing was reached from plasma positive samples. There were no MLST discordances within participants who had both positive swab and positive plasma specimens.

**Table 2: Baseline syphilis episode characteristics and laboratory results (intention-to-treat population)**

profiles were 9.73 (11 [39%] of 28 participants) and 1.3.1 (eight [29%] of 28 participants). Among the 12 swab specimens with cycle threshold values lower than 31 that were tested using WGS, 12 (100%) yielded complete genome sequences, revealing phylogenetic relationships (appendix pp 6–8). Additional whole-genome sequencing was attempted on three specimens with a CT value higher than 31 in patients experiencing a recurrent episode.

The per-protocol population consisted of 27 patients in the linezolid group and 28 in the BPG group (figure 1), because four of the overall 59 randomly assigned participants (two in each group) were excluded from the analysis: in the BPG group, one participant was excluded

	Linezolid	Penicillin	Difference in proportions (95% CI)
<b>Primary analysis</b>			
Composite primary endpoint (per protocol, n=55)	19/27 (70%; 49.8 to 86.2)	28/28 (100%; 87.7 to 100)	-29.6 (-50.5 to -8.8)
Clinical cure (n=33)	14/16 (88%; 61.7 to 98.4)*	17/17 (100%; 85.0 to 100)	..
Serological cure (n=47)	21/23 (91%; 72 to 98.9)†	24/24 (100%; 85.8 to 100)	..
Absence of relapse (n=55)	23/27 (85%; 66.3 to 95.8)	28/28 (100%; 87.7 to 100)	..
Composite primary endpoint (intention to treat, n=59)	19/29 (66%; 45.7 to 82.1)	28/30 (93%; 77.9 to 99.2)	-27.8 (-50.7 to -5.0)
<b>Sensitivity analysis‡</b>			
Composite primary endpoint (per protocol, n=55)	20/27 (74%; 53.7 to 88.9)	28/28 (100%; 87.7 to 100)	-25.9 (-46.1 to -5.8)

Data are presented as n/N (%; 95% CI) unless otherwise stated. RPR=rapid plasma reagin. \*Clinical cure was not assessed for 11 patients with early-latent syphilis in the linezolid group, and 11 patients with early-latent syphilis in the penicillin group. †The RPR response was not assessed for the eight patients with primary syphilis and negative RPR at baseline, four in the linezolid group and four in the penicillin group. ‡In the sensitivity analyses, one participant with recurrent symptoms but a non-typeable strain was treated as if they did not have a relapse. The outcome proportion is reported with the exact CI using the Clopper-Pearson method.

**Table 3: Efficacy analysis**

because they did not pass screening (presenting with a genital ulcer but negative RPR and PCR results), and another participant had taken azithromycin 1 week before randomisation. In the linezolid group, one participant was excluded because of screening failure and another participant because of loss to follow-up. In the per-protocol analysis, the criteria for non-inferiority were not met for the primary composite endpoint of clinical cure, serological cure, and absence of relapse. Overall, 19 (70%) of 27 patients assigned to linezolid were cured compared with 28 (100%) of 28 patients in the BPG group (table 3). The incidence of the individual components of the primary endpoint also differed between groups. In the intention-to-treat population (patients with missing data were regarded as having treatment failure), 19 (66%) of 29 patients in the linezolid group and 28 (93%) of 30 patients in the BPG group were cured (table 3).

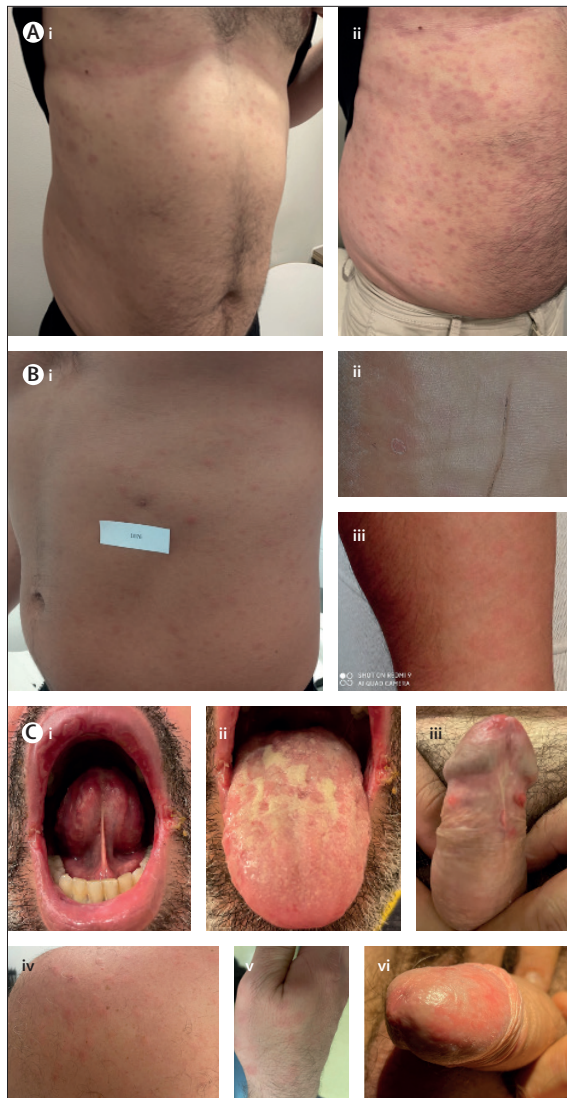
Among the 55 participants in the per-protocol population, individuals with skin or mucosal lesions in primary or secondary stage were monitored for clinical cure after treatment, whereas participants with (asymptomatic) latent-stage syphilis were not assessed for clinical cure. In 14 (88%) of 16 participants in the linezolid group and in 17 (100%) of 17 participants in the BPG group, the lesions had either resolved or were in the healing process. The remaining two patients in the linezolid group, who both had secondary syphilis, were classified as having no clinical response to treatment (figure 2A; patients 1–2, table 4). Both cases tested positive for syphilis on the second PCR test.

In the per-protocol population, 23 (85%) of 27 participants in the linezolid group and 24 (86%) of 28 in the BPG group had a positive serology at baseline, whereas four (15% and 14%, respectively) in each group, all with primary syphilis, had a negative serology (but positive PCR). 21 (91%) of 23 individuals in the linezolid group and 24 (100%) of 24 in the BPG group reached serological cure, and two (9%) of 23 participants in the

linezolid group did not exhibit a reduction in RPR titres (patients 3–4, table 4).

Four (7%) of 55 participants had recurrent clinical symptoms, all in the linezolid group (patients 5–8, table 4); two participants had primary syphilis at baseline and had recurrent primary lesions at 5 weeks and 6 weeks after baseline, whereas two other participants had secondary syphilis with recurrent secondary rashes at 5 weeks and 8 weeks after baseline (figure 2B, C). In three (75%) of four cases in the linezolid group, the MLST analyses confirmed syphilis with the same allelic profile (type 9.7.3) in the second episode as in the first episode. We attempted to gain further genomic resolution beyond strain type, and WGS of recurrence pairs was attempted, yielding a partial genome and complete genome for each pair. Nucleotide sequences of covered loci were identical. In the remaining one case of recurrent syphilis in the linezolid group, the oral basal swab was negative, and the specimen taken at relapse was not typable. Among the four patients in the linezolid group with a recurrence, three reported at least one sexual contact with a new partner, and one had sexual contact with the same partner who was untreated. One patient had concurrent infections with *Herpes simplex* virus type 2 and *Chlamydia trachomatis* serovar L2 (causative of lymphogranuloma venereum; table 4).

Although the protocol did suggest doing a lumbar puncture in the event of clinical or serological failure, none were done as the patients declined. These patients were retreated with BPG, and subsequently showed favourable clinical and serological progress. Among participants who met the criteria for cure (19 [70%] of 27 in the linezolid group and 28 [100%] of 28 in the BPG group, in the per-protocol population), one (5%) of 19 participants in the linezolid group and three (11%) of 28 participants in the BPG group had a four-fold decrease in RPR titre, followed by a subsequent four-fold increase, leading to classification as reinfections.



**Figure 2: Clinical manifestations of participants with persistence or recurrence of symptoms despite linezolid treatment**  
 (A) Patient with secondary syphilis presented with maculopapular exanthema at baseline (Ai), which persisted and worsened 12 weeks after linezolid treatment (Aii). (B) Patient with secondary syphilis presented with maculopapular exanthema at baseline, which initially improved (Bii), but later relapsed with the same type of lesions affecting the extremities (Biii) and palms and soles (Bii), 5 weeks after linezolid treatment. (C) Patient with secondary syphilis presented with oral ulcers (Ci), mucous patches (Cii), and genital lesions at baseline (Ciii), who was clinically cured, and subsequently had a relapse with maculopapular exanthema and genital lesions (Civ, Cv, Cvi), 8 weeks after linezolid treatment.

In the safety population (intention-to-treat population), 23 (79%) of 29 patients in the linezolid group and 24 (80%) of 30 in the BPG group had an adverse event. Adverse events related to the study medications were documented in five (17%) of 29 patients in the linezolid group, and five (17%) of 30 in the BPG group (all mild or moderate; appendix p 9). Individual patients had the potential to report several adverse events. Specifically, among the five individuals receiving linezolid,

two reported diarrhoea, one reported stomach pain, three reported headache, one reported lumbar pain, and one reported a Jarisch-Herxheimer reaction. Among the five patients who received BPG, one patient reported urticaria, one reported diarrhoea, one reported vomiting, three reported headache, two reported lumbar pain, one reported fever, and three reported a Jarisch-Herxheimer reaction.

Following the trial discontinuation, post-hoc analyses done through Monte Carlo simulations showed that a single dose of 600 mg once per day resulted in a probability of target attainment value of 68%, meaning that approximately a third of patients were predicted to be non-responsive to linezolid at this dosage. By contrast, a regimen of 600 mg twice per day showed a probability of target attainment value of 99%. The details of the Monte Carlo simulation leading to these values of probability of target attainment are provided in the appendix (pp 10–11).

## Discussion

In this RCT evaluating the efficacy of linezolid for the treatment of syphilis, linezolid 600 mg per day for 5 days did not meet the prespecified non-inferiority criteria for the primary composite endpoint comprising clinical cure, serological cure, and absence of relapse. The overall response was 19 (70%) of 27 in the linezolid group and 28 (100%) of 28 in the BPG group, with a treatment difference of  $-29.6\%$  (95% CI  $-50.5$  to  $-8.8$ ). The results of the interim analysis prompted the Data and Safety Monitoring Board to terminate the trial prematurely because of futility.

Previous in-vitro studies have shown activity of linezolid against *T pallidum*.<sup>26</sup> However, in this trial, the dosing of linezolid used (once per day) might have been too low or the duration of the treatment course (5 days) might have been too short for effectively treating syphilis. Selecting an appropriate dose regimen for antibiotic repurposing is complex. Despite licensed regimens for linezolid in adults typically recommending 600 mg twice per day,<sup>28</sup> we chose a once-per-day regimen of 600 mg in our study to simplify the regimen and potentially improve adherence.<sup>44</sup> We expected this dosage to be effective on the basis of initial pharmacokinetic–pharmacodynamic calculations, with fAUC<sub>24</sub>:MIC ratios used as predictors of efficacy in other bacteria.<sup>30</sup> However, this approach to dose selection has limitations, because it relies on point estimates and might not account for patient-specific factors such as age, gender, weight, and individual variations in drug metabolism, which can influence linezolid efficacy. Alternative mathematical models, such as Monte Carlo simulations, can more easily consider variability and might offer more accurate predictions of effectiveness in the population.<sup>15,45,46</sup> After discontinuing the trial, we aimed to determine whether the lower efficacy, compared with what was anticipated, could be ascribed to insufficient levels of antibiotic

Baseline data		Serological criteria				Clinical criteria at the time of outcome event			Molecular criteria at the time of outcome event		Sexual behavior and STI since baseline at the time of outcome event				
Person living with HIV	Syphilis stage and symptoms	RPR	PCR results (cycle threshold); type of swab	MLST allelic profiles	RPR week 12	RPR week 24	RPR week 48	Time from baseline to outcome event	Symptoms	RPR	Time from baseline to outcome event	PCR results (cycle threshold); type of swab	MLST allelic profile	Sexual contacts	STI screening
<b>Lack of clinical or serological response</b>															
Patient 1	No	Secondary, generalised rash	1/32	Positive (32.9); oral swab	NT	..	..	..	Persistence; generalised rash	1/64	9 weeks	Positive (35.2); oral swab	NT	1	NA
Patient 2 (patient A in figure 2)	No	Secondary, generalised rash	1/64	Negative (NA); oral swab	NA	..	..	..	Persistence; generalised rash	1/64	12 weeks	Positive (35.7); oral swab	9.X.X†	5	Negative
Patient 3	Yes, CD4 572, viral load 38 copies per mL	Secondary, genital, palmar and plantar rash	1/32	Positive (34.4); oral swab	1.179	1/64	1/32	49 weeks	None	..	..	..	..	1 treated	NA
Patient 4	Yes, CD4 456, viral load undetectable	Primary, genital ulcer	1/16	Positive (34.9); genital ulcer	3.2.3	1/64	NA	24 weeks	None	..	..	..	..	1 treated	NA
<b>Clinical recurrence of syphilis</b>															
Patient 5	No	Primary, genital ulcer	Negative	Positive (30.7); genital ulcer	9.73*	..	..	..	Recurrence with Follmann balanitis	1/1	5 weeks	Positive (28.2); genital ulcer	9.73*	1 new	HSV-2 and LGV
Patient 6	No	Primary, genital ulcer	Negative	Positive (26.3); genital ulcer	9.73*	..	..	..	Recurrence of chance	Negative	6 weeks	Positive (31.6); genital ulcer	9.73†	1 new	Negative
Patient 7 (patient C in figure 2)	No	Secondary, genital rash, oral ulcers, and mucous plaques	1/2048	Positive (33.2); genital swab	9.73 †	..	..	..	Recurrence of genital rash and generalised rash	1/1024	8 weeks	Positive (29.1); genital swab	9.73†	1 untreated partner	NA
Patient 8 (patient B in figure 2)	No	Secondary, generalised rash	1/32	Negative (NA); oral swab	NA	..	..	..	Recurrence with generalised rash	1/16	5 weeks	Positive (35.3); forearm skin ulcer	NT	Several	NA

All patients presented here were in the linezolid group. All patients received a single dose of benzathine penicillin G 2.4 million international units, at the time of outcome event. MLST=multilocus sequence typing. NA=not available. NT=not typable by MLST. LGV=venerum lymphogranuloma. RPR=rapid plasma reagin. STI=sexually transmitted infection. HSV-2=herpes simplex virus 2. WGS=whole-genome sequencing. \*Full genome sequencing by WGS. †Partial genome sequencing by WGS. ‡Partially typed by MLST.

**Table 4: Baseline characteristics, follow-up results, and outcomes of patients who had no treatment response or recurrence**

exposure. Given that we did not directly measure the concentration of linezolid in the patients' blood, we did a post-hoc pharmacokinetic–pharmacodynamic analysis and Monte Carlo simulations using data from the literature, which confirmed that 600 mg/24 h yields a probability of treatment success of 68%, whereas a dose of 600 mg/12 h achieves a probability of success of 99%.

The failure of the proposed regimen might have also been related to the short duration of the treatment course. In the original experiments by Eagle and colleagues,<sup>31,32</sup> maintaining penicillin concentrations for 48–96 h cleared *T pallidum* from chancres; however, many syphilologists believed that prolonged exposure of 5–7 days or more was required to clear treponemes that might persist in the lymph nodes and tissues.<sup>33,34</sup> There are no clinical trials on the duration of treatment and, in real life, syphilis has commonly been treated with BPG or other depot formulations that maintain treponemicidal concentrations for periods of 7–10 days or longer. Second-line treatments such as ceftriaxone or doxycycline are also typically administered for 10–14 days.<sup>4</sup> The optimal duration of treatment for early syphilis remains unknown, but it is possible that efficacy of a linezolid regimen could increase with an extended (eg, 10-day) regimen.

In our study, we used innovative MLST and WGS testing methods to differentiate relapse from reinfection in cases of recurring syphilis symptoms. MLST typing was used on initial and recurrent episode samples, and it improved the accuracy of relapse identification. Three of four recurrence cases had the same MLST type in both the first and second episodes, with one case being untypeable. However, the MLST approach has limitations. Reinfection with the same strain can result from contact with an untreated partner, and the low genetic diversity (type diversity index 0–20), suggests localised transmission networks.<sup>47,48</sup> Therefore, it is possible for someone to be reinfected with the same MLST type even from a different partner. To address this challenge, we used WGS, which has greater discrimination capability to identify different strains, even among samples with the same MLST (appendix pp 6–7).<sup>49</sup> Notably, this technique showed no sequence variation between sample pairs among loci with coverage, providing additional reassurance in our ability to determine relapse accurately. The main drawback of WGS that we noted was that, despite the use of DNA enrichment methods, the low bacterial load of syphilis infection, especially in secondary and early-latent syphilis,<sup>50,51</sup> makes achieving a complete WGS dataset difficult. Another new technique used in the trial involved using oral swabs from healthy mucosa for DNA detection in secondary and early-latent syphilis. This direct method overcomes serology limitations and enables strain identification in non-ulcerating presentations, with 60% test positivity in secondary syphilis and 5% in early-latent syphilis, consistent with previous findings.<sup>52,53</sup>

This study has several limitations. First, we included individuals with different stages of syphilis within a single trial. Syphilis stages might exhibit variations in the bacterial burden, replicative state, and invasion of immunologically privileged sites, and these differences might lead to different clinical outcomes. Notably the failure rate in secondary syphilis, the most disseminated stage of the infection, was higher than in other stages of syphilis. Close monitoring of failure rates by disease stage should be included in future studies. Second, the study could not be masked because of the different administration routes of the compared treatments. This is particularly relevant for subjective assessments; however, the inclusion of quantifiable clinical variables (eg, lesion healing) and laboratory results (ie, serological cure and molecular cure) within the composite primary endpoint minimises the risk of bias associated with unmasking. Finally, the absence of female participants hinders the generalisability of our findings to the broader population. The absence of female participants is primarily caused by the substantial 9:1 male-to-female ratio in syphilis cases in Spain, and the fact that female individuals typically receive care from gynaecologists, with less frequent visits to STI clinics. This limitation underscores the need for more inclusive research to address the gender-specific aspects of syphilis, considering variations in manifestations (eg, primary chancres going unnoticed in less visible areas in women) and diagnostic challenges.

In summary, the efficacy of a regimen of linezolid 600 mg per day for 5 days was not found to be non-inferior to BPG in the treatment of early syphilis because of higher rates of clinical failure, serological failure, and relapse. Hence, the use of linezolid 600 mg per day for 5 days is not recommended to treat patients with early syphilis. Nevertheless, linezolid still has intrinsic advantages relative to penicillin, and on the basis of our modelling, investigating the efficacy of a higher-dose and longer-duration regimens is worthwhile.

#### Contributors

OM, MU, and MV-M conceived, designed, and planned the study. MU, MA, AR, AM, VD, and AA managed participant recruitment and follow-up. CP-M, MF, AR-G, and AC conducted pharmacological calculations. PN-B, YH-M, EN, NAPL, ALG, and LG did the laboratory work. DO, OM, and MU were responsible for data management. DO and MM did the statistical analyses. All authors contributed to manuscript preparation, provided critical reviews, and gave their approval for manuscript submission.

#### Declaration of interests

RP received grants or contracts from MSD and Viiv Healthcare (payments to his institution) and consulting fees from Pfizer, Gilead, GSK, AstraZeneca, Atea, and Roche. AC has received payment or honoraria for lectures, presentations, speakers' bureaus, manuscript writing, or educational events from Pfizer, Merck, Biomerieux, Becton, and Seegene, and has received support for attending meetings or travel from Beckman. YH-M has grants or contracts with Seegene (payments to his institution). All other authors declare no competing interests.

#### Data sharing

The complete de-identified dataset collected for our study will be made available at GitHub. Raw reads and consensus genomes that support

the findings of this study are available in NCBI Bioproject PRJNA723099.

#### Acknowledgments

We thank Gerard Carot-Sans for providing medical writing support with manuscript preparation and Roser Escrig for her support in the study design and for medical writing assistance with the study documentation. We also thank Laia Bertran and Miquel Angel Rodríguez for the operational and financial management of the project. We would like to acknowledge the contributions of Cristina Miranda, Melani Novas, Alba San José, Aroa Nieto, Judith Cartiel, Nerea Cid, Lucía Rubio, and Tania Baena from the Clinical Trials Unit for their valuable support; and Gemma Dulsat, Gabriel Bauzá, Júlia Carabia, and Helena Pera from the Contract Research Organization. This project has been primarily funded by the European Research Council under the EU's Horizon 2020 research and innovation programme (850450) and it has received additional funding from the Fondo de Investigaciones Sanitarias from Instituto de Salud Carlos III.

#### References

- Mitjà O, Padovese V, Folch C, et al. Epidemiology and determinants of reemerging bacterial sexually transmitted infections (STIs) and emerging STIs in Europe. *Lancet Reg Health Eur* 2023; **34**: 100742.
- Goldenberg RL, Thompson C. The infectious origins of stillbirth. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **189**: 861–73.
- Moseley P, Bamford A, Eisen S, et al. Resurgence of congenital syphilis: new strategies against an old foe. *Lancet Infect Dis* 2023; published online Aug 18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00314-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00314-6).
- Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočnik M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2021; **35**: 574–88.
- WHO. Global shortages of penicillin. Feb 9, 2023. <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/stis/treatment/shortages-of-penicillin> (accessed Feb 9, 2023).
- Nelson R. Syphilis rates soar in the USA amid penicillin shortage. *Lancet* 2023; **402**: 515.
- Nurse-Findlay S, Taylor MM, Savage M, et al. Shortages of benzathine penicillin for prevention of mother-to-child transmission of syphilis: an evaluation from multi-country surveys and stakeholder interviews. *PLoS Med* 2017; **14**: e1002473.
- Ueleres Braga J, Araujo RS, de Souza ASS. The shortage of benzathine penicillin and its impact on congenital syphilis incidence: an ecologic study in the city of Rio de Janeiro. *Clin Infect Dis* 2021; **72**: e79–87.
- Wendel GD Jr, Stark BJ, Jamison RB, Molina RD, Sullivan TJ. Penicillin allergy and desensitization in serious infections during pregnancy. *N Engl J Med* 1985; **312**: 1229–32.
- US Centers for Disease Control and Prevention. Syphilis. Oct 15, 2022. <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/syphilis.htm> (accessed Oct 15, 2022).
- Mitjà O, Suñer C, Giacani L, et al. Treatment of bacterial sexually transmitted infections in Europe: gonorrhoea, Mycoplasma genitalium, and syphilis. *Lancet Reg Health Eur* 2023; **34**: 100737.
- Riedner G, Rusizoka M, Todd J, et al. Single-dose azithromycin versus penicillin G benzathine for the treatment of early syphilis. *N Engl J Med* 2005; **353**: 1236–44.
- Hook EW 3rd, Behets F, Van Damme K, et al. A phase III equivalence trial of azithromycin versus benzathine penicillin for treatment of early syphilis. *J Infect Dis* 2010; **201**: 1729–35.
- Beale MA, Marks M, Sahi SK, et al. Genomic epidemiology of syphilis reveals independent emergence of macrolide resistance across multiple circulating lineages. *Nat Commun* 2019; **10**: 3255.
- Fernández-Naval C, Arando M, Espasa M, et al. Enhanced molecular typing and macrolide and tetracycline-resistance mutations of *Treponema pallidum* in Barcelona. *Future Microbiol* 2019; **14**: 1099–108.
- Xiao Y, Liu S, Liu Z, et al. Molecular subtyping and surveillance of resistance genes in *Treponema pallidum* DNA from patients with secondary and latent syphilis in Hunan, China. *Sex Transm Dis* 2016; **43**: 310–16.
- Cao Y, Su X, Wang Q, et al. A multicenter study evaluating ceftriaxone and benzathine penicillin G as treatment agents for early syphilis in Jiangsu, China. *Clin Infect Dis* 2017; **65**: 1683–88.
- Bettuzzi T, Jourdes A, Robineau O, et al. Ceftriaxone compared with benzylpenicillin in the treatment of neurosyphilis in France: a retrospective multicentre study. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 1441–47.
- Ando N, Mizushima D, Omata K, et al. Combination of amoxicillin 3000 mg and probenecid versus 1500 mg amoxicillin monotherapy for treating syphilis in patients with human immunodeficiency virus: an open-label, randomized, controlled, non-inferiority trial. *Clin Infect Dis* 2023; **77**: 779–87.
- Stafylis C, Keith K, Mehta S, et al. Clinical efficacy of cefixime for the treatment of early syphilis. *Clin Infect Dis* 2021; **73**: 907–10.
- Taylor MM, Kara EO, Araujo MAL, et al. Phase II trial evaluating the clinical efficacy of cefixime for treatment of active syphilis in non-pregnant women in Brazil (CeBra). *BMC Infect Dis* 2020; **20**: 405.
- Tsai JC, Lin YH, Lu PL, et al. Comparison of serological response to doxycycline versus benzathine penicillin G in the treatment of early syphilis in HIV-infected patients: a multi-center observational study. *PLoS One* 2014; **9**: e109813.
- Chen K-H, Sun H-Y, Chen C-H, et al. Higher serologic responses of early syphilis to single-dose benzathine penicillin G plus doxycycline versus single-dose benzathine penicillin G alone among people with human immunodeficiency virus (HIV). *Clin Infect Dis* 2023; **1**: ciad508.
- Girometti N, Junejo MH, Nugent D, et al. Clinical and serological outcomes in patients treated with oral doxycycline for early neurosyphilis. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 1916–19.
- Edmondson DG, Hu B, Norris SJ. Long-term in vitro culture of the syphilis spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *MBio* 2018; **9**: 3.
- Haynes AM, Giacani L, Mayans MV, et al. Efficacy of linezolid on *Treponema pallidum*, the syphilis agent: a preclinical study. *EBioMedicine* 2021; **65**: 103281.
- Tantalo LC, Lieberman NAP, Pérez-Mañá C, et al. Antimicrobial susceptibility of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*: an in-vitro study. *Lancet Microbe* 2023; **4**: e994–1004.
- Food and Drug Administration. ZYVOX. Summary of product characteristics. 2010. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/021130s022lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021130s022lbl.pdf) (accessed May 14, 2023).
- Nahid P, Mase SR, Migliori GB, et al. Treatment of drug-resistant tuberculosis. An official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; **200**: e93–142.
- Hui L, Bodolea C, Vlase L, Hiriscu EI, Popa A. Linezolid administration to critically ill patients: intermittent or continuous infusion? A systematic literature search and review. *Antibiotics* 2022; **11**: 436.
- Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. The effective concentrations of penicillin in vitro and in vivo for streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum*. *J Bacteriol* 1950; **59**: 625–43.
- Eagle H, Magnuson HJ, Fleischman R. Relation of the size of the inoculum and the age of the infection to the curative dose of penicillin in experimental syphilis, with particular reference to the feasibility of its prophylactic use. *J Exp Med* 1947; **85**: 423–40.
- Idsoe O, Guthe T, Christiansen S, Krag P, Cutler JC. A decade of reorientation in the treatment of venereal syphilis. *Bull World Health Organ* 1954; **10**: 507–61.
- Kitchen DK, Rein CR. Time-dosage relation in penicillin therapy with special reference to yaws. I. Laboratory basis for effective therapy. *Bull World Health Organ* 1953; **8**: 77–89.
- Pantuzza LL, Ceccato MDGB, Silveira MR, Junqueira LMR, Reis AMM. Association between medication regimen complexity and pharmacotherapy adherence: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol* 2017; **73**: 1475–89.
- Pellock JM, Smith MC, Cloyd JC, Uthman B, Wilder BJ. Extended-release formulations: simplifying strategies in the management of antiepileptic drug therapy. *Epilepsy Behav* 2004; **5**: 301–07.
- Grillová L, Bawa T, Mikalová L, et al. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. *PLoS One* 2018; **13**: e0200773.
- Roychoudhury P. *T pallidum* WGS, forked from assembly and annotation of *Treponema pallidum* genomes. GitHub. [https://github.com/michellejlin/tpallidum\\_WGS#readme-ov-file](https://github.com/michellejlin/tpallidum_WGS#readme-ov-file) (accessed Aug 28, 2023).

- 39 Lieberman NAP, Lin MJ, Xie H, et al. *Treponema pallidum* genome sequencing from six continents reveals variability in vaccine candidate genes and dominance of Nichols clade strains in Madagascar. *PLoS Negl Trop Dis* 2021; **15**: e0010063.
- 40 Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis; an epidemiologic investigation of the natural course of the syphilitic infection based upon a re-study of the Boeck-Bruusgaard material. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1955; **35** (suppl 34): 3–368.
- 41 EUCAST. Linezolid. Rationale for the EUCAST clinical breakpoints. Version 1.0. <http://www.eucast.org> (accessed May 28, 2023).
- 42 Rodríguez-Gascón A, Aguirre-Quiñonero A, Aspiazú MAS, Canut-Blasco A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of tedizolid phosphate compared to linezolid for the treatment of infections caused by gram-positive bacteria. *Antibiotics* 2021; **10**: 755.
- 43 Maiden MCJ, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013; **11**: 728–36.
- 44 Laliberté F, Bookhart BK, Nelson WW, et al. Impact of once-daily versus twice-daily dosing frequency on adherence to chronic medications among patients with venous thromboembolism. *Patient* 2013; **6**: 213–24.
- 45 Trang M, Dudley MN, Bhavnani SM. Use of Monte Carlo simulation and considerations for PK-PD targets to support antibacterial dose selection. *Curr Opin Pharmacol* 2017; **36**: 107–13.
- 46 Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, Isla A. The role of PK/PD analysis in the development and evaluation of antimicrobials. *Pharmaceutics* 2021; **13**: 833.
- 47 Fernández-Naval C, Arando M, Espasa M, et al. Multilocus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Barcelona. *Future Microbiol* 2021; **16**: 967–76.
- 48 Giacani L, Ciccarese G, Puga-Salazar C, et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* strains from four Italian hospitals shows geographical differences in strain type heterogeneity, widespread resistance to macrolides, and lack of mutations associated with doxycycline resistance. *Sex Transm Dis* 2018; **45**: 237–42.
- 49 Pinto M, Borges V, Antelo M, et al. Genome-scale analysis of the non-cultivable *Treponema pallidum* reveals extensive within-patient genetic variation. *Nat Microbiol* 2016; **2**: 16190.
- 50 Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1668–73.
- 51 Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 546–52.
- 52 Towns JM, Leslie DE, Denham I, et al. *Treponema pallidum* detection in lesion and non-lesion sites in men who have sex with men with early syphilis: a prospective, cross-sectional study. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 1324–31.
- 53 Towns JM, Chow EPF, Wigan R, et al. Anal and oral detection of *Treponema pallidum* in men who have sex with men with early syphilis infection. *Sex Transm Infect* 2022; **98**: 570–74.
- 54 Zheng X, Ye M, Liao C, Shang M, et al. A new specimen for syphilis diagnosis: evidence by high loads of *Treponema pallidum* DNA in saliva. *Clin Infect Dis* 2021; **73**: E3250–58.

# THE LANCET

## Infectious Diseases

### Supplementary appendix

This appendix formed part of the original submission and has been peer reviewed. We post it as supplied by the authors.

Supplement to: Ubals M, Nadal-Baron P, Arando M, et al. Oral linezolid compared with benzathine penicillin G for treatment of early syphilis in adults (Trep-AB Study) in Spain: a prospective, open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2024; published online Jan 8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00683-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00683-7).



# Oral linezolid compared with benzathine penicillin G for treatment of early syphilis: a randomized-controlled clinical trial

## Supplementary appendix

### Contents

<b>Supplementary methods</b> .....	2
Selection criteria.....	2
PK-PD Rationale for Selection of Initial Linezolid dose .....	3
Assessment for neurosyphilis.....	3
Molecular analyses.....	4
Molecular Detection.....	4
Multilocus sequence typing.....	4
Whole Genome Sequencing .....	4
<b>Supplementary results</b> .....	5
Baseline characteristics .....	5
Whole Genome Sequencing results.....	6
Adverse events .....	9
Post-hoc Monte Carlo Simulation for Re-assessing the Linezolid Regimen .....	10
References .....	11

# Supplementary methods

## Selection criteria

### Inclusion Criteria

1. Aged 18 years or older at baseline visit.
2. Primary, secondary or early latent syphilis diagnosis based on the International Union Against STIs Treatment Guidelines\*.
  - a. Primary syphilis is defined as the presence of a typical ulcer (chancre) and a positive test using darkfield examination (DFE) or Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of *T. pallidum*, with or without a positive serological test for syphilis.
  - b. Secondary syphilis is defined by typical clinical signs and symptoms along with positive serological treponemal and non-treponemal tests.
  - c. Early latent syphilis is defined as positive serological treponemal and non-treponemal tests without clinical evidence of disease, either with a previous negative syphilis serology, or a four-fold increase in RPR titer of a non-treponemal test within the past 12 months.
3. Signature of written informed consent.
4. Ability to comply with the requirements of the study protocol.
5. If women of childbearing potential, use of a highly effective method of contraception (abstinence, hormonal contraception, intra-uterine device [IUD], or anatomical sterility in self or partner) committed during 1 week after last IMP administration.
6. If men, use of condom during heterosexual intercourse and use of a highly effective method of contraception (abstinence, hormonal contraception, intra-uterine device [IUD], or anatomical sterility in self or partner) in female partner committed during 1 week after last investigational medicinal product (IMP) administration.

\* For same-day inclusion, eligible patients with no prior history of syphilis and negative serological tests for syphilis within the last 12 months could be enrolled with a positive result on either a treponemal Rapid Diagnostic Test (RDT) or the dual treponemal and non-treponemal test (Chembio Dual Path Platform Syphilis Screen & Confirm Assay (DPP)). In the case of patients with a history of syphilis and negative non-treponemal tests within the last 12 months, inclusion was contingent on obtaining a positive DPP result. For all cases, additional confirmation through the methods outlined in sections a), b), or c) was mandatory.

### Exclusion Criteria

1. Known allergy to any of the investigational medicinal products and/or excipients, particularly known hypersensitivity to penicillin, cephalosporins or other beta-lactam agents and/or allergy to soya or peanut.
2. Lactose or galactose intolerance or glucose-galactose malabsorption.
3. Diagnosis criteria of symptomatic neurosyphilis.
4. Pregnant or breastfeeding women.
5. Concurrent use of drugs with potential interactions with the study medication. <sup>a</sup>
6. Antibiotic treatment potentially active against *T. pallidum* (i.e., beta lactams, cephalosporines, macrolides, tetracyclines) in the past week.

7. Uncontrolled hypertension, pheochromocytoma, thyrotoxicosis, carcinoid syndrome, bipolar disorder, incapacitating psycho-affective disturbance, acute confusional state.
8. Renal function impairment requiring hemodialysis.
9. Concomitant symptomatic STI (i.e., gonorrhoea, chlamydia, lymphogranuloma venereum, *Mycoplasma genitalium*) or other infectious disease requiring antibiotic treatment potentially active against *T. pallidum*.
10. Having received treatment for the early syphilis recently diagnosed within the past 6 months.

<sup>a</sup> Drugs potentially interacting with investigational products: Monoamine oxidase (MAO) inhibitors, Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), Tricyclic antidepressants, Serotonin 5-HT<sub>1</sub> receptor agonists, Sympathomimetic, dopaminergic and adrenergic agents, CNS stimulant drugs, Opioid narcotics.

### PK-PD Rationale for Selection of Initial Linezolid dose

The selected dose of linezolid was determined based on a simulation of drug concentrations throughout the dosing period. The linezolid dosing regimen was selected to ensure an fAUC<sub>24h</sub>/MIC ratio greater than 100, which is considered adequate for effective treatment of other bacterial infections.[1]

According to the approved Prescriber Information (Summary of Product Characteristics),[3] the pharmacokinetics of a single dose of linezolid 600 mg results in a C<sub>max</sub> of 12.7 mg/L, T<sub>max</sub> of 1.28 hours, a half-life of 4.26 hours, AUC<sub>24h</sub> of 91.4 ug·h/ml, AUC<sub>24h</sub>-CNS 63·9 µg·h/mL, fAUC<sub>24h</sub> 64.0 µg·h/mL, and the fAUC<sub>24h</sub>-CNS 44.8 µg·h/mL .[3] The MIC of linezolid for *T. pallidum* is 0·5 µg/mL, as determined *in vitro*.[2] **Therefore, the proposed regimen was expected to achieve an fAUC<sub>24h</sub>/MIC of 128.0 which exceeds 100.**

MIC µg/ml	AUC <sub>24h</sub> /MIC	fAUC <sub>24h</sub> /MIC	AUC-CNS/ MIC	fAUC- CNS/MIC
4	22.9	16.0	16.0	11.2
2	45.7	32.0	32.0	22.4
1	91.4	64.0	64.0	44.8
<b>0.5</b>	<b>182.8</b>	<b>128.0</b>	<b>128.0</b>	<b>89.6</b>
0.25	365.6	255.9	255.9	179.1
0.125	731.2	511.8	511.8	358.3
0.06	1523.3	1066.3	1066.3	746.4
0.03	3046.7	2132.7	2132.7	1492.9

### Assessment for neurosyphilis

Patients with suspicious symptoms of neurosyphilis during the follow-up were scheduled for an additional visit for a thorough examination and sample collection. Lumbar puncture would be conducted only if clinically indicated, and cerebrospinal fluid would be collected for study purposes if the patient consented. Clinically indicated circumstances included:

- Neurological symptoms. A standardized questionnaire was used to assess neurologic symptoms [4].
- Increase in serum RPR titer in the absence of symptoms. Four-fold increase in serum RPR titer persisting >2 weeks at any time.

- Serological failure. Failure of a four-fold decline in serum RPR titer at 48 weeks.
- Four-fold decline in serum RPR titer, but persistent high RPR titer (i.e., > 1/8) at 48 weeks.
- Persistence or worsening of symptoms up to week 6 (or before if deemed necessary by the physician).

## Molecular analyses

### Molecular Detection

DNA extraction was performed using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) following standard protocols. A sample volume of 300 µL was utilized, and the DNA was eluted in 100 µL of RNase free-water. Quantification of the total DNA was conducted using the Thermo Scientific NanoDrop spectrophotometer.

The detection of *T. pallidum* was achieved through real-time polymerase chain reaction (qPCR) techniques, targeting the *tpp47* gene (*tp0574*).

### Multilocus sequence typing

For MLST analysis, PCR amplification was conducted on partial regions of the *tp0136*, *tp0548*, and *tp0705* genes. The resulting amplified fragments underwent Sanger sequencing, following the methodology outlined by Grillova et al. in 2018. Sequence analysis was performed using MEGA software version 11.0.13, specifically designed for Molecular Evolutionary Genetic Analysis. Additionally, the diversity index (TDI) was calculated by determining the ratio of the number of different sequences detected to the total number of fully typable samples.

### Whole Genome Sequencing

Whole genome sequencing was performed on all samples with a Ct value lower than 30 as well as recurrence pairs regardless of Ct. Pre-capture libraries were prepared using the Kapa Hyperplus Kit (Roche) with an 8-minute fragmentation time, followed by adapter ligation using the KAPA Unique Dual-Indexed Adapter Kit. Subsequent library cleanup was conducted using AMPure beads at a ratio of 0.8x (Beckman Coulter).

The capture step employed the Integrated DNA Technology's (IDT's) xGen Hybridization Capture protocol. Pools of 3-4 libraries with comparable genomic content were generated to obtain a starting DNA amount of 500 ng. Blocking was executed using Human Cot 1 DNA and TruSeq Blocking Oligos (IDT).

Biotin-labeled capture probes were designed to target the genome of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* SS14 (Accession Number Nucleotide: NC\_010741). After a 4-hour incubation period, the capture was performed utilizing streptavidin-coated beads. Amplification and purification were accomplished using AMPure beads at a 0.8x ratio. DNA concentration was determined using the Qubit assay (ThermoFisher), and size verification was carried out using TapeStation. Sequencing was performed on the NextSeq 2000 platform (Illumina) in a 2x150 format.

## Supplementary results

### Baseline characteristics

**Table S1.** Recreational substance use among study participants (ITT population)

	Overall, n (%)	Linezolid, n (%)	Penicillin, n (%)
	(N = 59)	(N = 29)	(N = 30)
<i>Yes</i>	15 (25.4)	7 (24.1)	8 (26.6)
<i>Cannabis</i>	9 (15.2)	4 (13.8)	5 (16.6)
<i>Ecstasy</i>	6 (10.2)	1 (3.4)	5 (16.6)
<i>GHB</i>	8 (13.5)	4 (13.8)	4 (13.3)
<i>Mephedrone</i>	3 (5.1)	1 (3.4)	2 (6.6)
<i>Popper</i>	7 (11.9)	4 (13.8)	3 (10.0)
<i>Viagra/Sildenafil</i>	4 (6.7)	2 (6.9)	2 (6.6)
<i>Cocaine/Crack</i>	3 (5.1)	1 (3.4)	2 (6.6)
<i>Ketamine</i>	1 (1.7)	1 (3.4)	0 (0.0)
<i>Methamphetamine</i>	1 (1.7)	0 (0.0)	1 (3.3)

Numbers provided are excluding alcohol consumption.

**Table S2.** Previous sexually transmitted infections among study participants (ITT population)

	Overall, n (%)	Linezolid, n (%)	Penicillin, n (%)
	(N = 59)	(N = 29)	(N = 30)
<i>Any previous STI</i>	51 (86.4)	26 (89.7)	25 (83.3)
<i>Syphilis</i>	37 (62.7)	19 (65.5)	18 (60.0)
<i>Gonorrhoea</i>	29 (49.2)	17 (58.6)	12 (40.0)
<i>Chlamydia</i>	22 (37.3)	12 (41.4)	10 (33.3)
<i>Herpes</i>	5 (8.5)	4 (13.8)	1 (3.3)
<i>Genital warts</i>	7 (11.8)	2 (6.9)	5 (16.6)
<i>Hepatitis C</i>	2 (3.4)	1 (3.4)	1 (3.3)
<i>Urethritis</i>	5 (8.5)	1 (3.4)	4 (13.3)
<i>Lymphogranuloma venereum</i>	2 (3.4)	1 (3.4)	1 (3.3)
<i>Proctitis</i>	2 (3.4)	1 (3.4)	1 (3.3)
<i>Anogenital ulcer</i>	1 (1.7)	0 (0.0)	1 (3.3)

## Whole Genome Sequencing results

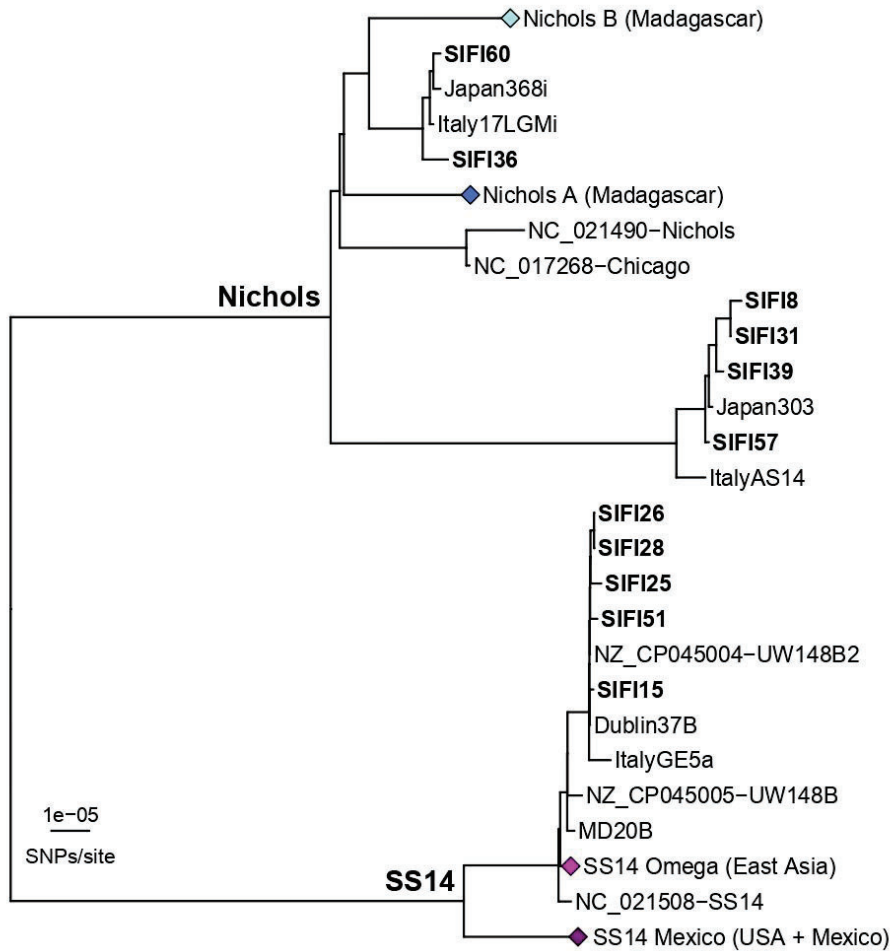
Among the 15 specimens sequenced, 12 yielded complete genome sequences, defined as < 1% missing data in consensus. MLST typing was performed using the WGS data obtained from the samples, with complete typing achieved for 15 (100%) out of 15 samples. Within the studied samples, five belonged to the SS14-Omega subclade (1.3.1 allelic profile), while ten samples were classified under the Nichols clade (3.2.3 or 9.7.3 allelic profile). The phylogenetic tree demonstrates the relationship between the 11 samples with complete genomes and recently sequenced clinical samples from various regions, including Europe (Italy, Ireland), the United States, China, and Madagascar. Notably, all these samples exhibited close phylogenetic proximity to the European isolates (Figure S1). The sequences were deposited in the Bioproject PRJNA723099 (NCBI) with accession numbers in Table S4.

**Table S3.** Characteristics and allelic profile by MLST of the specimens where whole genome sequences was achieved

Sample ID	Patient ID (Patient enumeration in Table 4)	Visit	Sample Type	Syphilis Stage	MLST typing (tp0136, tp0548 and/or tp0705)	CT	Clade or genetic group	WGS quality
Patients with only baseline specimen								
SIFI8	1007	Baseline	Oral swab	Secondary	9.7.3	27.7	Nichols-like	Complete
SIFI15	1114	Baseline	Genital Ulcer	Primary	1.3.1	27.4	SS14-like	Complete
SIFI25	1013	Baseline	Genital ulcer	Primary	1.3.1	30.4	SS14-like	Complete
SIFI26	1014	Baseline	Genital Ulcer	Primary	1.3.1	25.8	SS14-like	Complete
SIFI28	1016	Baseline	Genital Ulcer	Primary	1.3.1	26.4	SS14-like	Complete
SIFI31	1019	Baseline	Oral swab	Early Latent	9.7.3	27.9	Nichols-like	Complete
SIFI36	1025*	Baseline	Genital Ulcer	Primary	3.2.3	26.2	Nichols-like	Complete
SIFI51	1081	Baseline	Genital Ulcer	Primary	1.1.1	30.9	SS14-like	Complete
SIFI60	1088	Baseline	Genital Ulcer	Primary	3.2.3	26.6	Nichols-like	Complete
Patients with baseline and follow-up specimen								
SIFI53	1083 (Patient 5)	Baseline	Genital ulcer	Primary	9.7.3	30.7	Nichols-like	Partial
SIFI57	1083 (Patient 5)	Follow-up	Genital ulcer	Primary	9.7.3	28.2	Nichols-like	Complete
SIFI39	1027 (Patient 6)	Baseline	Genital ulcer	Primary	9.7.3	26.3	Nichols-like	Complete
1027_2	1027 (Patient 6)	Follow-up	Genital ulcer	Primary	9.7.3	31.6	Nichols-like	Partial
SIFI21	1121 (Patient 7)	Baseline	Genital ulcer	Primary	9.7.3	33.2	Nichols-like	Partial
1121_2	1121 (Patient 7)	Follow-up	Genital swab	Secondary	9.7.3	29.1	Nichols-like	Complete

\*Patient excluded in the PP population

**Figure S1.** Phylogenetic tree including 11 samples (SIFI) from the Trep-AB Study project, for which complete genomes could be obtained, as well as 16 clinical samples from Italy, Ireland, Madagascar, the United States, and Japan, and the laboratory strains SS14 and Nichols. Branch length is scaled to SNPs per genomic position. Nodes without SIFI samples have been collapsed for ease of display.



**Table S4.** Accession numbers of the sequences deposited to NCBI BioProject PRJNA1027463

<b>Sample</b>	<b>BioSample</b>	<b>Partial/Complete Genome</b>
SIFI8	SAMN37795116	Complete
SIFI15	SAMN33714959	Complete
SIFI25	SAMN37795117	Complete
SIFI26	SAMN33714960	Complete
SIFI28	SAMN33714961	Complete
SIFI31	SAMN37795118	Complete
SIFI36	SAMN33714962	Complete
SIFI39	SAMN37795119	Complete
SIFI51	SAMN33714963	Complete
SIFI57	SAMN37795120	Complete
SIFI60	SAMN33714964	Complete
SIFI21	SAMN37797342	Partial
SIFI53	SAMN37797343	Partial
rec1027-2	SAMN37797340	Partial
rec1121-2	SAMN37797341	Complete



## Adverse events

**Table S5.** Adverse events reported during the study, No. (%) (Safety Population = ITT population)

	<b>Overall, n (%)</b>	<b>Linezolid, n (%)</b>	<b>Penicillin, n (%)</b>
	N= 59	N= 29	N= 30
Participants with any AE	47 (79.6)	23 (79.3)	24 (80.0)
Participants with AE not related to the medication	41 (69.5)	21(72.4)	21 (70.0)
Participants with AE related to the medication	10 (16.9)	5 (17.2)	5 (16.6)
<b>AE severity</b>			
- Participants with mild AEs	30 (50.8)	14 (48.3)	16 (53.4)
- Participants with moderate AEs	17 (28.8)	9 (31.0)	8 (26.6)
- Participants with severe AEs	0	0	0
<b>Participants with AE related with medication by type</b>			
Abdominal pain	1 (1.6)	1 (3.4)	0
Diarrhea	3 (5.0)	2 (6.8)	1 (3.3)
Headache	6 (10.1)	3 (10.3)	3 (10.0)
Vomiting	1 (1.6)	0	1 (3.3)
Urticaria	1 (1.6)	0	1 (3.3)
Lumbar pain	3 (5.0)	1 (3.4)	2 (6.6)
Fever	1 (1.6)	0	1 (3.3)
Jarisch-Herxheimer reaction	4 (6.7)	1 (3.4)	3 (10.0)
<b>Participants with AE not related with medication by type</b>			
Other STI during the follow-up	11 (18.6)	4 (13.8)	7 (23.3)
Upper Respiratory Tract infection	9 (15.2)	5 (17.2)	4 (13.3)
Syphilis symptoms*	18 (30.5)	8 (27.6)	10 (33.3)
Other	13 (22.0)	4 (13.8)	9 (30.0)

\*Include asthenia, painful swallowing, oral ulcers, worsening of exanthem, bone pain, painful adenopathies, weight loss.

## Post-hoc Monte Carlo Simulation for Re-assessing the Linezolid Regimen

For PK/PD analysis, plasma clearance (CL) of linezolid was obtained from ZYVOX® FDA data sheet [3]; the selected CL value ( $127 \pm 48$  mL/min) corresponds to adults after receiving 600 mg tablet. Unbound fraction (0.7) was obtained from a previous PK/PD study on linezolid [5], and the minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained from an in vitro study investigating the activity of linezolid in cultures of *T. pallidum* [2].

The Probability of target attainment (PTA), defined as the probability that a specific value of a PK/PD index associated with the efficacy of the antimicrobial treatment is achieved at a certain MIC, was estimated by Monte Carlo simulation [6]. Ten thousand subject simulations were conducted using Ora-cle® Crystal Ball Fusion Edition v.11.1.2.3.500 (Oracle USA Inc., Redwood City, CA). The values of  $fAUC_{24}/MIC$  (area under the free drug concentration-time curve at steady state over 24 hours to MIC ratio) were calculated for linezolid (600 mg q12h and 600 q24 h and 600 q8h) over an MIC range of serial two-fold dilutions from 0.03 to 64 mg/L. The following equation was used [7]:

$$fAUC_{24}/MIC = D \times Fu/CL$$

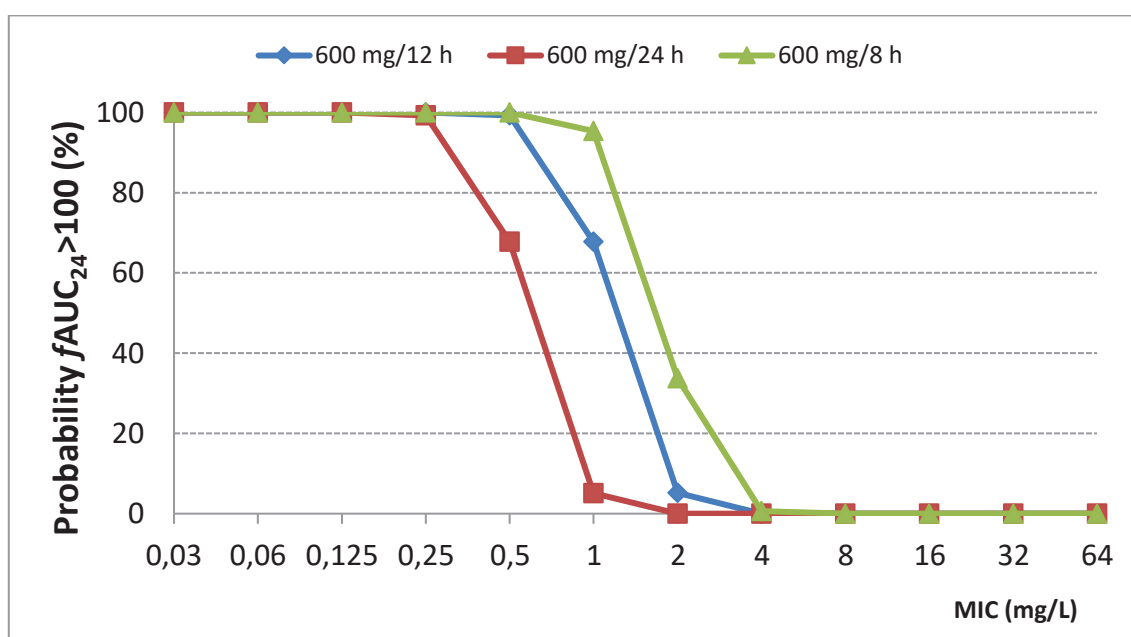
where D is the daily dose, Fu is the unbound fraction, and CL is de total clearance.

$fAUC_{24}/MIC > 100$  was selected as the PK/PD target [8].

For simulations, a log-normal distribution was assumed for CL, according to statistical criteria. Unbound fraction was included as a fix value.

PTA  $\geq 80\%$  but  $< 90\%$  was associated with moderate probabilities of success, whereas PTA  $\geq 90\%$  was considered as optimal against that bacterial population.

**Figure S2.** Simulation linezolid regimen output



**Table S6.** Probability of target attainment (PTA) indicates the efficacy of linezolid regimen is achieved at a certain MIC estimated by Monte Carlo simulation

MIC (mg/L)	PTA (%)		
	600 mg/8 h	600 mg/12 h	600 mg/24 h
0.03	100	100	100
0.06	100	100	100
0.125	100	100	100
0.25	100	100	99
0.5	100	99	68
1	95	68	5
2	34	5	0
4	1	0	0
8	0	0	0
16	0	0	0
32	0	0	0
64	0	0	0

## References

- [1]. Hui L. Linezolid Administration to Critically Ill Patients : Intermittent or Continuous Infusion ? A Systematic Literature Search and Review. 2022;
- [2]. Haynes AM. Efficacy of linezolid on *Treponema pallidum*, the syphilis agent: A preclinical study. *EBioMedicine*. 2021 Mar 1;65.
- [3]. Food and Drug Administration (FDA). ZYVOX® Summary of product characteristics [Internet]. 2010 [cited 2023 May 14]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/021130s0221bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021130s0221bl.pdf)
- [4]. Davis AP. How well do neurologic symptoms identify individuals with neurosyphilis? *Clin Infect Dis*. 2018;66(3):363–7.
- [5]. Rodríguez-Gascón A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of tedizolid phosphate compared to linezolid for the treatment of infections caused by gram-positive bacteria. *Antibiotics*. 2021;10(7):755.
- [6]. Mouton JW. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(5):601–7.
- [7]. Asín E. Comparison of antimicrobial pharmacokinetic/pharmacodynamic breakpoints with EUCAST and CLSI clinical breakpoints for Gram-positive bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(4):313–22.
- [8]. EUCAST. Linezolid. Rationale for the EUCAST clinical breakpoints [Internet]. Version 1.0. [cited 2023 May 28]. Available from: <http://www.eucast.org>



## Estudi 2

### Evaluating the Accuracy of Self-Collected Swabs for the Diagnosis of Mpox

M. Ubals\*, EJ. Tarín-Vicente\*, X. Oller, A. Mendoza, A. Alemany, Á. Hernández-Rodríguez, C. Casañ, Á. Rivero, P. Coll, JM. Cabrera, M. Vall, M. Agud-Dios, E. Gil-Cruz, A. Paris de Leon, A. Ramírez-Marinero, MD. Folgueira, MA. Meléndez, V. Buhiiichyk, C. Galván-Casas, R. Paredes, N. Prat, MR. Sala Farré, JM. Bonet-Simó, PL. Ortiz-Romero, B. Clotet, PJ. Cardona, I. Blanco, M. Marks, C. Suñer\*\* and O. Mitjà\*\*; Movie Group.

Clin Infect Dis. 3 Apr 2023; 76 (7): 1311-1314.

**Factor d'Impacte 11,8/ Quartil 1.**

#### Resum:

#### **Introducció**

El diagnòstic de l'Mpox es basa en la detecció d'ADN viral mitjançant PCR en diverses mostres corporals. En el brot de l'any 2022, el rendiment diagnòstic més elevat es va obtenir de mostres de lesions cutànies, tot i que el virus també es va detectar amb freqüència en hisops d'orofaringe i rectals. En algunes infeccions de transmissió sexual (ITS) s'han validat mètodes d'auto mostra per tal de facilitar-ne la recollida i el diagnòstic. Tanmateix, en el cas de l'Mpox, aquest procediment no ha estat validat; per tant, no es pot garantir que l'automostreig per part dels pacients proporcioni la mateixa exactitud diagnòstica que la recollida de mostres per part dels professionals sanitaris.

#### **Mètodes**

Es va avaluar l'exactitud en el rendiment diagnòstic de mostres provinents d'exsudats de lesions cutànies, d'orofaringe i rectals recollides en 50 pacients inscrits en l'estudi 3 de dinàmica viral d'Mpox. A la visita inicial (dia 0), un metge recollia mostres de lesions cutànies i/o d'orofaringe i recte (quan fos necessari) i al dia següent (dia 1) el pacient realitzava l'autopresa de les mateixes mostres, després d'haver estat instruït pel professional sanitari. Totes les mostres es van analitzar mitjançant PCR quantitativa (qPCR) per a la detecció d'ADN del virus de la verola

del mico (MPXV). Es va calcular la concordança global entre la qPCR del dia 0 (referència) i la del dia 1, utilitzant l'estadística kappa.

## **Resultats**

Es va disposar de mostres aparellades de 49, 38 i 10 individus, procedents de lesions cutànies, d'orofaringe i de recte, respectivament. La concordança global entre les mostres del dia 0 i les del dia 1 va ser del 98 % (48/49) en lesions cutànies, 79 % (30/38) en orofaringe i 90 % (9/10) en recte. No es van observar diferències significatives entre el nombre de cicles (Ct) de les mostres recollides pels pacients en comparació amb les recollides pels professionals sanitaris. La diferència absoluta de Ct entre la recollida del professional i el pacient va ser del 1,1 (IC95% -0,3 a 2,5;  $p = 0,41$ ) per lesions cutànies, del -0,02 (IC95% -1,9 a 1,9;  $p = 0,75$ ) per l'orofaringe i del -1,2 (IC95% -4,8 a 2,4;  $p = 0,73$ ) per les rectals.

## **Conclusions**

L'automostreig és una estratègia fiable per a diagnosticar l'Mpox.

## Evaluating the Accuracy of Self-Collected Swabs for the Diagnosis of Mpox

Maria Ubals,<sup>1,2,3,a</sup> Eloy José Tarín-Vicente,<sup>4,a</sup> Xènia Oller,<sup>1,2</sup> Adrià Mendoza,<sup>1,5</sup> Andrea Alemany,<sup>1,2,3</sup> Àgueda Hernández-Rodríguez,<sup>6,7</sup> Cristina Casañ,<sup>6</sup> Àngel Rivero,<sup>2,5</sup> Pep Coll,<sup>2,5</sup> José Miguel Cabrera,<sup>2,5</sup> Martí Vall,<sup>1,2</sup> Manuel Agud-Dios,<sup>4</sup> Elena Gil-Cruz,<sup>4</sup> Alexia Paris de Leon,<sup>6</sup> Aida Ramírez Marinero,<sup>6</sup> María Dolores Folgueira,<sup>8,9,10</sup> María Ángeles Meléndez,<sup>8,9</sup> Vira Buhiiichyk,<sup>2</sup> Cristina Galván-Casas,<sup>2,11</sup> Roger Paredes,<sup>2,12</sup> Nuria Prat,<sup>13</sup> Maria-Rosa Sala Farré,<sup>14</sup> Josep Maria Bonet-Simó,<sup>13</sup> Pablo L. Ortiz-Romero,<sup>4</sup> Bonaventura Clotet,<sup>2,12,15,16,17</sup> Pere-Joan Cardona,<sup>6,7,18</sup> Ignacio Blanco,<sup>19</sup> Michael Marks,<sup>20,21,22,b</sup> Clara Suñer,<sup>1,2,b</sup> and Oriol Mitjà,<sup>1,2,16,23,b</sup> The Movie Group<sup>c</sup>

<sup>1</sup>Skin Neglected Diseases and Sexually Transmitted Infections Section, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>2</sup>Fight Infectious Diseases Foundation, Badalona, Spain; <sup>3</sup>Facultat de Medicina, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Dermatology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; <sup>5</sup>BCN Checkpoint, Projecte dels NOMS—Hispanosida, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Microbiology Department, Clinical Laboratory North Metropolitan Area, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>7</sup>Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>8</sup>Microbiology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; <sup>9</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain; <sup>10</sup>Department of Medicine, Medical School, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; <sup>11</sup>Departamento de Dermatología, Hospital Universitario de Móstoles, Madrid, Spain; <sup>12</sup>Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>13</sup>Direcció d'Atenció Primària—Metropolitana Nord, Sabadell, Spain; <sup>14</sup>Servei de Vigilància Epidemiològica i Resposta a Emergències de Salut Pública al Vallès Occidental i Vallès Oriental, Public Health Agency of Catalonia, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain; <sup>15</sup>IrsiCaixa AIDS Research Institute & Fundació Lluita Contra les Infeccions, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>16</sup>Universitat de Vic—Universitat Central de Catalunya (UVIC-UCC), Vic, Spain; <sup>17</sup>Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; <sup>18</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain; <sup>19</sup>Clinical Genetics Department, Clinical Laboratory North Metropolitan Area, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>20</sup>Clinical Research Department, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, United Kingdom; <sup>21</sup>Hospital for Tropical Diseases, London, United Kingdom; <sup>22</sup>Division of Infection and Immunity, University College London, London, United Kingdom; and <sup>23</sup>School of Medicine and Health Sciences, University of Papua New Guinea, Port Moresby, Papua New Guinea

We evaluated the accuracy of patient-collected skin lesions, oropharyngeal, and rectal swabs among 50 individuals enrolled in a study of mpox viral dynamics. We found that the performance of self-collected samples was similar to that of physician-collected samples, suggesting that self-sampling is a reliable strategy for diagnosing mpox.

**Keywords.** mpox; diagnostic; self-sampling; PCR.

Received 20 September 2022; editorial decision 07 November 2022; published online 12 November 2022

<sup>a</sup>M. U. and E. J. T.-V. are joint co-first authors.

<sup>b</sup>M. M., C. S., and O. M. are joint senior co-authors.

<sup>c</sup>The Movie Group members are listed in the Notes section.

Correspondence: C. Suñer, Skin Neglected Diseases and Sexually Transmitted Infections Section, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain (csuner@lluia.org).

Clinical Infectious Diseases® 2023;76(7):1311–4

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

<https://doi.org/10.1093/cid/ciac889>

In early 2022, an outbreak of mpox was reported in Europe, and cases have subsequently been reported worldwide [1]. Unlike previous mpox outbreaks, individuals infected during 2022 have been predominantly men who have sex with men without any history of travel to an endemic country or contact with animal reservoirs. Based on clinical and risk factor data, transmission during sex appears to be the primary driver of the current epidemic, and patients typically present with a high frequency of skin lesions in the genital, perianal, and perioral region and proctitis, tonsillitis, and penile oedema as the most common complications [2–4].

Diagnosis of mpox relies on detecting viral DNA by polymerase chain reaction (PCR) testing [5] in several body specimens. In the current outbreak, the highest yield has been reported in samples collected from skin lesions, although the virus is also frequently detectable in oropharyngeal and rectal swabs, as well as in blood [3, 6]. Detection in urine and semen has been reported in some studies, but these samples are not routinely used for diagnosis [7].

Self-sampling is a strategy where the patient—and not a healthcare provider—collects the clinical samples required for diagnosis. This strategy has been well established for the diagnosis of many sexually transmitted infections, with similar performance to samples collected by physicians [8, 9]. More recently, self-sampling has been shown to be a reliable strategy for detecting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection [10]. To test the performance of this strategy in the mpox setting, we nested an evaluation of self-sampling within a more extensive study on the viral dynamics of mpox.

### METHODS

#### Participants

We conducted a prospective diagnostic accuracy evaluation in individuals with suspected mpox in 3 centers in Spain. All patients presenting to participating centers with lesions suggestive of mpox and compatible symptoms starting within the 10 days preceding screening underwent a standardized clinical assessment by a dermatologist or a specialist in sexually transmitted infections and were invited to participate. Patients who required hospital admission were not included in the study.

#### Procedures

At the baseline visit, a physician collected clinical samples, including lesion, oropharyngeal, and rectal swabs as appropriate (study day 0, physician-collected samples). Participants were provided with home testing kit materials, which included an instruction sheet and devices for self-collection (ie, Dacron-tipped swabs,

pre-labeled swab containers, and a mailing envelope); they were trained for self-collection of samples and asked to self-collect swabs from the same skin lesions, the oropharynx, and the rectum the following day (study day 1, self-collected samples). The instructions given to patients for self-collection of samples are detailed in the [Supplementary Appendix](#). The swabs (reference 901101, Taizhou Sun Trine Biotechnology Co., Ltd) were immediately placed in 3 mL of viral transport medium (reference 304305KF; Deltalab). Participants were instructed to keep samples at 4°C after collection and contact the parcel courier service, which transferred the samples to the Microbiology Laboratory of the University Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). The parcel courier service provided the secondary and tertiary containers, and samples were transported at 4°C. All samples were delivered to the laboratory within 24 hours from their collection. Specimens were received at the laboratory and stored at 4°C until processed if they could be analyzed within 12 hours after reception. Samples to be analyzed later than 12 hours and those left over were stored at -80°C. All samples were analyzed for the detection of mpox virus DNA by quantitative PCR (qPCR). Nucleic acid extraction was performed using the Nimbus platform (Hamilton Company, Reno, NV, USA), according to the manufacturer's instructions. qPCR was performed using the LightMix Modular Mpx Virus assay (TIB MolBiol, Berlin, Germany) with LightMix Modular MSTN Extraction Control (TIB MolBiol) as the internal control. A thermocycler QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) was used to amplify a 106-base-pair-long fragment of the J2L/J2R gene from mpox virus [5]. Applied Biosystems Interpretive Software was used for detection and data analysis. Patients with a positive result in any of the samples collected by a physician on day 0 were classified as having mpox virus and therefore included in the study analyses.

### Statistical Analysis

Continuous and categorical variables are presented as medians and interquartile range (IQR), defined by 25th and 75th percentiles and number (%), respectively. We considered that discrepant results might occur in either direction (ie, a physician-collected swab might be negative and a self-collected swab positive or vice versa) because of sampling error. Therefore, we calculated the overall agreement between self-collected swabs on study day 1 (index test) and physician-collected swabs on study day 0 (reference test) using the kappa statistic. In a secondary analysis, we compared the cycle threshold (Ct) values between physician- and self-collected samples using a Wilcoxon paired *t* test. The cutoff Ct value for real-time amplification assays was 40, above which the sample was considered negative. All analyses were conducted in R version 4.2.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

### Ethical Approval

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Germans Trias i Pujol. Written informed consent was obtained from all participants.

### RESULTS

We enrolled 50 patients with suspected mpox. All of the patients were male, and the median age was 33.5 years (IQR: 28–45.5 years). All patients had PCR-confirmed mpox in at least 1 of the diagnostic specimens collected. The median time from symptoms onset was 5 days (IQR: 4–6 days). At baseline, 49 individuals had a skin lesion swab collected (all of which were positive), 38 had an oropharyngeal swab collected (26 [68%] were positive), and 11 had a rectal swab collected (9 [82%] were positive).

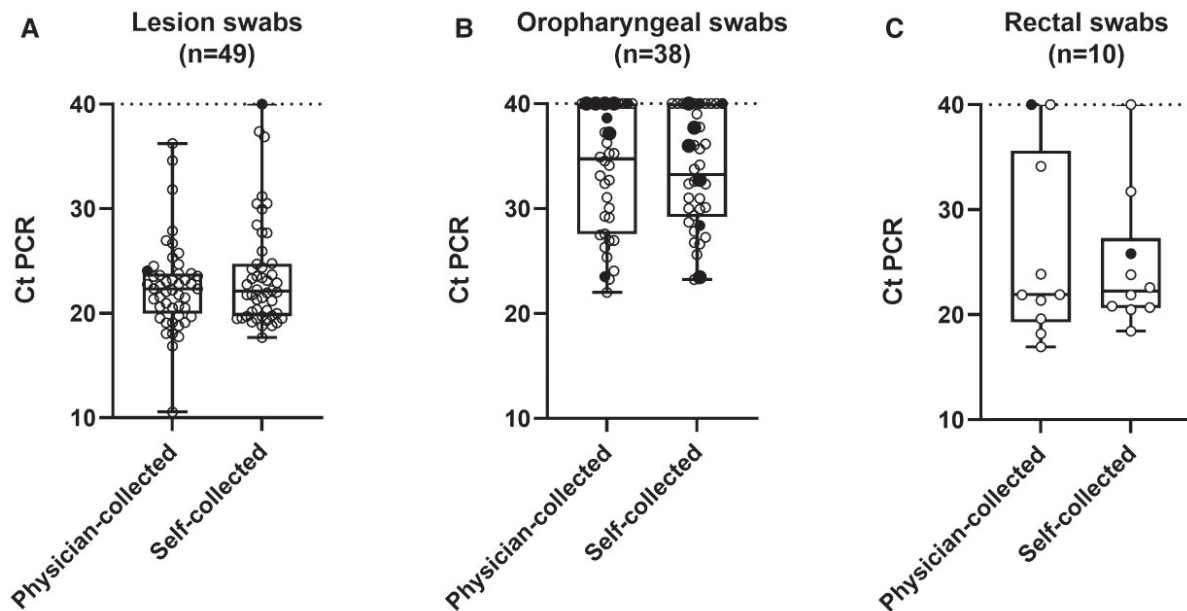
Paired samples were available in 49, 38, and 10 individuals for skin lesions, oropharyngeal, and rectal specimens, respectively ([Figure 1](#)). The highest overall agreement was observed in lesional skin swabs (98% agreement), where only 1 individual tested negative in the physician-collected swab and positive in the self-collected swab. For oropharyngeal and rectal specimens, the overall agreement was 79% (30/38; kappa: 0.49) and 90% (9/10; kappa: 0.6), respectively.

We found no significant differences in Ct values between physician- and self-collected skin lesion and oropharyngeal specimens. The mean Ct values of physician- and self-collected lesion swabs were 22.5 and 23.6, respectively (absolute difference: 1.1; 95% confidence interval [CI]: -0.3 to 2.5; *P* = .41). The mean Ct values for physician- and self-collected oropharyngeal swabs were 33.5 and 33.6, respectively (absolute difference: -0.02; 95% CI: -1.9 to 1.9; *P* = .75). The mean Ct values for physician- and self-collected rectal samples were 25.8 and 24.6 (absolute difference: -1.2; 95% CI: -4.8 to 2.4; *P* = .73).

### DISCUSSION

This is the first study to demonstrate the feasibility and accuracy of self-collected samples for the diagnosis of mpox. Overall, self-collected swabs had high accuracy and Ct values similar to physician-collected swabs. Self-sampling for the diagnosis of sexually transmitted infections utilizing self-taken oropharyngeal, genital, and rectal swabs is a well-established strategy for diagnosing chlamydia and gonorrhea based on nucleic acid amplification testing [8, 9]. Our data extend these findings to confirm the applicability of this strategy in mpox. Importantly, we show patient-collected samples from skin lesions to have similarly high performance characteristics. Unlike the other types of samples, patient-collected skin swabs are not routinely used to diagnose common blistering skin diseases such as herpes or varicella, which require unroofing of the lesion, but our data demonstrate the applicability of this approach for the diagnosis of mpox.





	Lesional swab	Throat swab	Rectal swab
Both positive	48 (98.0%)	23 (60.5%)	8 (80%)
Both negative	0 (0%)	7 (18.4%)	1 (10%)
Physician-collected positive / Self-collected negative	0 (0%)	5 (13.2%)	1 (10%)
Physician-collected negative / Self-collected positive	1 (2.0%)	3 (7.9%)	0 (0%)
Total	49 (100%)	38 (100%)	10 (100%)

**Figure 1.** Concordance and discordance between physician and self-collected swabs. Cycle threshold (Ct) values of swabs collected by the physician on day 0 compared with self-collection by the patient on day 1. Concordant results are shown as clear circles. Discordant results are colored black. The Ct value of 1 skin lesion swab that was positive on day 0 was not available and this sample and its corresponding day 1 sample were therefore not included in the figure. Abbreviation: PCR, polymerase chain reaction.

The agreement between physician- and self-taken oropharyngeal swabs was lower than for other samples. Oropharyngeal swabs are likely more prone to variation in the quality of sample collection compared with easily visualized skin lesions or rectal swabs. We believe that differences in sampling most likely explain these discordant results; however, fluctuations in viral load within the oropharynx are also possible.

Our study has some limitations. First, we enrolled a limited number of participants. Ideally, a larger sample size would allow greater precision in our estimates of accuracy. However, our findings are consistent with a considerable burden of literature on self-sampling; therefore, it seems unlikely that a larger sample size would fundamentally alter our findings. Second, the type of samples taken on day 0 was at the physician's discretion before patient enrollment. Consequently, some patients without proctitis lacked a physician-collected sample, resulting in fewer paired rectal samples than in other locations. Nevertheless, our data are consistent with existing literature indicating a similar

performance of self-collected and physician-collected rectal samples [11]. Finally, samples for the reference and index tests were taken 1 day apart. Although test performance studies are typically cross-sectional, we considered that samples taken at home without professional support or supervision would provide a more accurate view of the diagnostic performance based on self-sampling. Physician-collected samples that tested positive at baseline and negative by self-collection on day 1 could reflect a true negative due to clearance of the virus rather than inadequate sampling. However, we equally noted that some samples, in particular oropharyngeal swabs self-collected on day 1, tested positive despite a negative result on day 0 on the physician-collected sample. Considering that the Ct values were very similar at both time points, it seems most likely that these changes represent variation in sampling rather than real changes in viral load.

Our data confirm that a variety of self-taken samples can be used to reliably diagnose mpox in individuals with suspected signs of mpox infection. The self-sampling strategy offers a

number of potential advantages for patients and disease control and facilitates the integration of mpox into routine testing for other sexually transmitted infections in high-risk populations. Further work to optimize sample collection, including consideration of other types of samples, such as saliva, could be considered to further enhance the ease of testing.

### Supplementary Data

[Supplementary materials](#) are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

### Notes

**Acknowledgments.** The authors thank Gerard Carot-Sans for editing the final draft and Roser Escrig for medical writing assistance with the study documentation. They also thank Laia Bertran, Sergi Gavilan, and Miquel Angel Rodríguez for the operational and financial management of the project.

**Financial support.** This work was supported by the JoEmCorono crowdfunding campaign.

O. M., C. S., M. U., and A. A. are supported by the European Research Council grant agreement number 850450 (European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program, ERC-2019-STG funding scheme).

**Potential conflicts of interest.** M. V. reports support for attending meetings and/or travel for AIMID 2022 (Oviedo, Spain), paid to the author. All other authors report no potential conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

**The Movie Group.** Fight Infectious Diseases Foundation, Badalona, Spain: José Ramón Santos, MD, PhD; Lucía Bailón, MD; Susana Benet, MD; Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain: Jorge Arroyo Andres, MD; Lorena Calderón

Lozano, MD; Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain: Yolanda Maltas Hidalgo; Ramona Hervas Perez; Laura Clotet Romero, MD.

### References

1. Antinori A, Mazzotta V, Vita S, et al. Epidemiological, clinical and virological characteristics of four cases of monkeypox support transmission through sexual contact, Italy, May 2022. *Eurosurveillance* **2022**; 27:2200421.
2. Thornhill JP, Barkati S, Walmsley S, et al. Monkeypox virus infection in humans across 16 countries—April–June 2022. *N Engl J Med* **2022**; 387:679–91.
3. Tarín-Vicente EJ, Alemany A, Agud-Dios M, et al. Clinical presentation and virological assessment of confirmed human monkeypox virus cases in Spain: a prospective observational cohort study. *Lancet* **2022**; 400:661–9.
4. Patel A, Bilinska J, Tam JCH, et al. Clinical features and novel presentations of human monkeypox in a central London centre during the 2022 outbreak: descriptive case series. *BMJ* **2022**; 378:e072410.
5. Olson VA, Laue T, Laker MT, et al. Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J Clin Microbiol* **2004**; 42:1940–6.
6. Adler H, Gould S, Hine P, et al. Clinical features and management of human monkeypox: a retrospective observational study in the UK. *Lancet Infect Dis* **2022**; 22:1153–62.
7. Lapa D, Carletti F, Mazzotta V, et al. Monkeypox virus isolation from a semen sample collected in the early phase of infection in a patient with prolonged seminal viral shedding. *Lancet Infect Dis* **2022**; 22:1267–9.
8. Chernesky M, Jang D, Gilchrist J, et al. Head-to-head comparison of second-generation nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* on urine samples from female subjects and self-collected vaginal swabs. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:2305–10.
9. Wilson JD, Wallace HE, Loftus-Keeling M, et al. Swab-yourself Trial with Economic Monitoring and Testing for Infections Collectively (SYSTEMATIC): part 2. A diagnostic accuracy and cost-effectiveness study comparing rectal, pharyngeal, and urogenital samples analyzed individually, versus as a pooled sp. *Clin Infect Dis* **2021**; 73:e3183–93.
10. Tu Y-P, Jennings R, Hart B, et al. Swabs collected by patients or health care workers for SARS-CoV-2 testing. *N Engl J Med* **2020**; 383:494–6.
11. van der Helm JJ, Hoebe CJPA, van Rooijen MS, et al. High performance and acceptability of self-collected rectal swabs for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in men who have sex with men and women. *Sex Transm Dis* **2009**; 36:493–7.

# Evaluating the accuracy of self-collected swabs for the diagnosis of monkeypox

## Supplementary Appendix

Instructions for patients for self-collection of lesional, oropharyngeal and rectal swabs

Lesion swab (several lesions) (DO NOT CONFUSE THE TUBE FOR LESION SWEAB and THE TUBE FOR PHARYNGEAL / RECTAL SWAB)

1. Wash and dry your hands.
2. Take the tube labeled as "lesion" and one of the swabs.
3. Rub the swab on a lesion, making some pressure and rolling the swab over the lesion 6 times. Make sufficient pressure to extract fluid from within the injured tissue.
4. Repeat the process on a minimum of three lesions (if possible).
5. Immediately, insert the swab into the tube of medium labeled as "lesion", breaking the top of the swab so that the tube can be closed with the swab inside.

Oropharyngeal swab (DO NOT CONFUSE THE PHARYNGEAL SWAB TUBE and THE LESION/RECTAL SWAB TUBE)

1. Wash and dry your hands.
2. Take the tube labeled as "Pharyngeal" and the second swab.
3. Open your mouth keeping your tongue at the bottom. Rub the swab firmly through the throat (oropharynx) during five seconds.
4. Immediately insert the swab into the tube of medium labeled as "PHARYNGEAL."

Rectal swab (DO NOT CONFUSE THE RECTAL SWAB TUBE with the LESION / PHARYNGEAL SWAB TUBE!)

1. Wash and dry your hands.
2. Take the tube labeled as "Rectal" and the third swab.
3. Introduce the swab through the anal sphincter 3 cm into the rectum and rotate the swab against the anal crypts for five seconds.
4. Immediately insert the swab into the tube of medium labeled as "RECTAL."



## Estudi 3

### **Viral dynamics in patients with monkeypox infection: a prospective cohort study in Spain**

C. Suñer\*, **M. Ubals\***, EJ. Tarín-Vicente\*, A. Mendoza, A. Alemany, Á. Hernández-Rodríguez, C. Casañ, V. Descalzo, D. Ouchi, A. Marc, À. Rivero, P. Coll, X. Oller, JM. Cabrera, M. Vall-Mayans, MD. Folgueira, MA. Melendez, M. Agud-Dios, E. Gil-Cruz, A. Paris de Leon, A. Ramírez-Marinero, V. Buhiiichyk, C. Galván-Casas, R. Paredes, N. Prat, MR. Sala-Farre, JM. Bonet-Simó, M. Farré, PL. Ortiz-Romero, B. Clotet, V. García-Patos, J. Casabona, J. Guedj, PJ. Cardona, I. Blanco, M. Marks\*\* and O. Mitjà\*\*; Movie Group.

Lancet Infect Dis. Apr 2023; 23(4):445-453. Epub 12 Dec 2022.

**Factor d'Impacte 56,3/ Quartil 1.**

#### **Resum:**

#### **Introducció**

S'ha detectat l'ADN del virus de la verola del mico (MPXV) en lesions cutànies, saliva, orofaringe, orina, semen i femta de pacients infectats durant el brot de 2022 per la soca I1b; tanmateix, la dinàmica viral dins d'aquests compartiments corporals segueix sent desconeguda. L'objectiu de l'estudi va ser caracteritzar la cinètica viral, calculant les càrregues virals (CV) al llarg del temps en diverses localitzacions corporals. L'objectiu secundari era descriure la presència de virus amb capacitat de replicació a través de cultius virals en un subgrup de pacients.

#### **Mètodes**

Es tracta d'un estudi observacional, prospectiu i multicèntric que incloïa pacients ambulatoris diagnosticats d'Mpox en dos hospitals i dues clíniques de salut sexual a Espanya, entre el 28 de juny de 2022 i el 22 de setembre de 2022. Homes i dones majors de 18 anys eren elegibles si reportaven l'aparició de símptomes durant els 10 dies anteriors a la visita basal i eren inelegibles si la malaltia era prou greu com per ser ingressats a l'hospital. Es van recollir mostres de cinc

localitzacions corporals (lesions cutànies, orofaringe, recte, semen/vagina i sang seca) en sis moments temporals diferents fins a 57 dies després de la visita basal. Les mostres es van analitzar per PCR quantitativa (qPCR) i un subgrup d'elles per cultiu viral. L'objectiu principal era calcular el temps des de l'aparició dels símptomes fins a l'eliminació de l'ADN viral.

## **Resultats**

En total, a l'estudi es van recollir 1.663 mostres de 77 participants. 75 (97 %) participants eren homes, l'edat mitjana era de 35,0 anys (RIQ 29,0–46,0) i 39 (51 %) eren persones que vivien amb el VIH. El temps mitjà des de l'inici dels símptomes fins a l'eliminació de l'ADN viral va ser de 25 dies (IC95% 23 a 28) a les lesions cutànies, 16 dies (13 a 19) a l'orofaringe, 16 dies (13 a 23) al recte, 13 dies (9 a 18) al semen i 1 dia (0 a 5) a la sang. El temps des de l'inici dels símptomes fins a l'eliminació de l'ADN viral per al 90 % dels casos va ser de 41 dies (IC95% 34 a 47) en lesions cutànies i de 39 dies (27 a 56) en el semen. La CV mitjana de les lesions cutànies va ser de  $7,3\log_{10}$  còpies/ml (RIQ 6,5-8,2) a la visita basal, en comparació amb  $4,6\log_{10}$  còpies/ml (2,9-5,8) en orofaringe,  $5,0\log_{10}$  còpies/ml (2,9-7,5) en recte,  $3,5\log_{10}$  còpies/ml (2,9-4,7) en semen i  $4,0\log_{10}$  còpies/ml (4,0-4,0) en sang. Els virus replicants es van aïllar a totes les localitzacions corporals amb nivells elevats d'ADN ( $> 6,5\log_{10}$  còpies/ml).

## **Conclusions**

En pacients immunocompetents amb malaltia lleu d'Mpox, les dades de qPCR suggereixen un període recomanable d'aïllament dels casos de 3 a 6 setmanes; però basant-se en la detecció de virus replicants mitjançant cultiu viral, aquest període es podria reduir. En base a les troballes d'aquesta cohort de pacients i en l'anàlisi de semen, l'ús prolongat del preservatiu després de la recuperació de l'Mpox podria no ser necessari.