

Epidemiologia genômica do *Treponema pallidum* na Clínica do Homem da AHF, Recife-PE

Centro de pesquisa brasileiro do estudo **GENUSS (INV-039669)**

Patrocinado por:

Aids Healthcare Foundation

Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill

Pesquisadoras principais:

Fernanda Fernandes Fonseca, MD, MSc

Diretora Médica Global Associada

Aids Healthcare Foundation

Departamento Médico e de Qualidade Global

Arlene C. Seña, MD, MPH

Professor de Medicina

Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill

Instituto de Saúde Global e Doenças Infeciosas

Fevereiro

2026

Sumário	2
Lista de abreviações.....	4
Lista de Figuras.....	5
Lista de Quadros e Tabelas.....	5
RESUMO DO PROTOCOLO DE PESQUISA.....	6
1 Introdução.....	7
2 Objetivos.....	10
3 Métodos.....	10
3.1 Desenho	10
3.2 Local	10
3.3 População com critérios de elegibilidade	11
3.4 Critérios de inclusão	11
3.5 Critérios de não inclusão	11
3.6 Procedimentos	12
3.6.1 Recrutamento	12
3.6.2 Inscrição	13
3.7 Registro dos dados e formulários de pesquisa	14
3.8 Tratamento das ISTs	15
4 Métodos Laboratoriais e armazenamento de amostras.....	15
4.1 Quantificação de DNA por PCR	15
4.1.1 Sequenciamento do genoma do <i>T. pallidum</i>	16
4.1.2 Análises de OMP do <i>T. pallidum</i>	16
4.1.3 PCR para úlceras genitais	16
4.2 Teste rápido treponêmico e não treponêmico para sífilis combinado (ChembBio)	17
4.3 Pesquisa de <i>Treponema</i> por campo escuro	17
4.4 Exame quantitativo de sífilis por VDRL	18
4.5 Etiquetagem, armazenamento e envio de amostras	19
5 Plano de Análise e principais variáveis.....	19
5.1 Análises das características dos participantes	19
5.2 Análises dos genomas de <i>T. pallidum</i>	20
5.3 Análises de patógenos das úlceras ano genitais	21
6 Riscos e benefícios potenciais.....	21
7 Resultados Esperados.....	22
8 Aspectos éticos.....	22
8.1 Processo para obtenção do consentimento informado livre e esclarecido	23
8.2 Confidencialidade do participante	23
8.3 Uso futuro de amostras armazenadas	24
8.4 Manuseio de dados e manutenção de registros	24
8.5 Responsabilidades pelo gerenciamento de dados	24
8.6 Fontes de dados	25
8.7 Retenção de registros do estudo	25
9 Controle de Qualidade.....	25
10 Disseminação.....	26
11 Cronograma.....	26
12 Orçamento (Quadro resumo 3).....	27
12.1 Pessoal	27
12.2 Viagens	28
12.3 Materiais e suprimentos	28
12.4 Incentivo ao paciente	28
12.5 Impressão	28

12.6	Custos indiretos administrativos	29
13	Equipe da Pesquisa	30
14	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
15	Lista de Anexos.....	32
15.1	Anexo I - Lista de verificação para inclusão e procedimentos.....	32
15.2	Anexo II - Formulário de elegibilidade e inclusão no estudo.....	32
15.3	Anexo III - Formulário de dados demográficos e de saúde geral.....	32
15.4	Anexo IV - Formulário de histórico sexual	32
15.5	Anexo V - Formulário de histórico de IST e HIV.....	32
15.6	Anexo VI - Formulário de sintomas e exame físico	32
15.7	Anexo VII - Formulário de diagnóstico e resultados de testes no local de atendimento.....	32
15.8	Anexo VIII - Formulário de coleta de amostras de pesquisa	32
15.9	Anexo IX - Formulário de resultados de laboratório clínico	32
15.10	Anexo X - Procedimentos para coleta de amostras de pesquisa clínica	32

Lista de abreviações

AHF	Aids Healthcare Foundation
CRF	Formulário de Relato de Caso
CRS	Centro de pesquisas clínicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RDC	República Democrática do Congo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ECL	Loop extracelular
GUD	Úlcera ano genital
HIPAA	Lei de Portabilidade e Responsabilidade de Seguros de Saúde
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Vírus do herpes simples
IATA	Associação Internacional de Transporte Aéreo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorização de armazenagem e potencial uso de amostras biológicas com informação identificadora para outros estudos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
LGV	Linfogranuloma venéreo
MSM	Homens que fazem sexo com homens
NCBI	Institutos Nacionais do Centro Nacional de Saúde para Informações sobre Biotecnologia
NIAID	Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas
OMP	Proteínas da membrana externa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
NIP	Número de identificação do participante
QA	Garantia de qualidade
CQ	Controle de qualidade
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RPR	Reagente plasmático rápido
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
POP	Procedimento operacional padrão
SST	Tubo separador de soro
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
TP	<i>Treponema pallidum</i> subs. <i>pallidum</i>
TPE	<i>Treponema pallidum</i> subs. <i>pertenue</i>
UNC-CH	Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
WGS	Sequenciamento do genoma completo

Lista de Figuras

Figura 1 - Amostras de genoma do TP por continente	8
Figura 2 - Curvas de rarefação	9
Figura 3 - Esquema do projeto do estudo para coleta prospectiva de amostras	13

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1 - Objetivo, resultado esperado e métodos de análise	20
Quadro 2 - Cronograma simplificado	26
Quadro 3 - Orçamento estimado original	29

RESUMO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

TÍTULO	EPIDEMIOLOGIA GENÔMICA DE <i>TREPONEMA PALLIDUM</i> NA CLÍNICA DO HOMEM DA AHF, RECIFE-PE
COORTE DE ESTUDO	80 pessoas inscritas com sífilis primária ou secundária não tratada e 80 pessoas úlcera genital
LOCAL	Clínica do Homem da AHF Brasil
DURAÇÃO DO ESTUDO	12 meses
DURAÇÃO DO ESTUDO PARA O PARTICIPANTE	Duração da primeira visita espontânea por sinal e/ou sintoma compatível com úlcera ano genital, considerando oferta e explicação do protocolo, assinatura do TCLE, realização da anamnese e coleta de dados clínicos e a coleta de amostras biológicas. O tratamento clínico e o seguimento serão garantidos como rotina estabelecida na Clínica do Homem, mas não fazem parte do estudo.
OBJETIVOS	1) Descrever a diversidade genômica em cepas de TP coletadas de amostras biológicas de pessoas atendidas na Clínica do Homem da AHF, em Recife-Brasil 2) Determinar a prevalência de outras ISTs entre participantes com úlceras ano-genitais, com ou sem sífilis concomitante, na Clínica do Homem da AHF, em Recife/PE-Brasil, usando métodos de detecção molecular.
DESENHO DO ESTUDO	Estudo observacional em centro de pesquisa único, parte de um estudo multicêntrico
TEMPO ESTIMADO PARA INCLUSÃO DO TOTAL DE PARTICIPANTES	04 meses

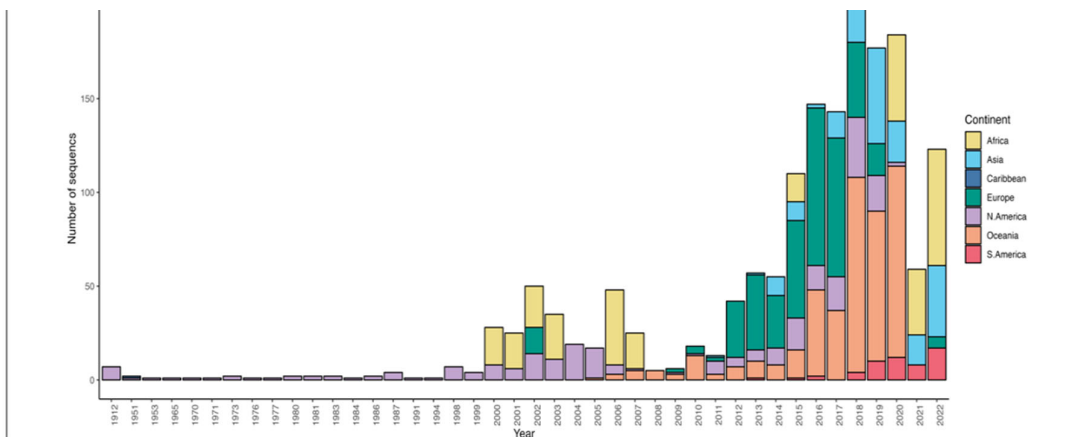
1 Introdução

O desenvolvimento da vacina contra a sífilis continua sendo uma alta prioridade em virtude da epidemia global e número crescente de casos de sífilis congênita em todo o mundo. O desenvolvimento da vacina ainda está em fase pré-clínica, e um trabalho translacional contínuo é necessário para identificar vacinas candidatas que tenham como alvo antígenos altamente conservados expostos à superfície, expressos por cepas geograficamente diversas de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* (*TP*). O sequenciamento do genoma completo (WGS) realizado a partir de amostras biológicas e testes de infectividade em coelhos aumentou o número de genomas disponíveis publicamente e o nosso entendimento da diversidade genética do *TP*. No entanto, a maioria das sequências genômicas *de TP* em bancos de dados disponíveis publicamente foi originada de cepas que circulam em países de alta renda. Apenas um pequeno número de países de baixa e média renda está representado nos dados genômicos globais de *TP*, resultando em um hiato crítico de conhecimento que deve ser preenchido para garantir uma vacina contra a sífilis globalmente eficaz.

Com o objetivo principal de fundamentar o desenvolvimento da vacina, foram inscritos em fase global do estudo participantes com infecções primárias de sífilis em seis locais geograficamente distintos estabelecidos pelo nosso consórcio global U19 apoiado pelo NIAID¹ e por um projeto recente apoiado pela Fundação Gates (INV-036560). Esses locais incluem Malawi, Colômbia, China, Vietnã, Argentina e Sri Lanka; a análise contínua dos 288 novos genomas gerados como parte desse projeto confirma subpopulações distintas de *TP* em países que anteriormente não tinham nenhuma ou somente pouca amostragem, incluindo mutações em genes que codificam alvos de vacinas candidatas. A análise filogenômica publicada recentemente e os dados do U19 do Malawi, Colômbia e China demonstraram uma predominância de cepas de *TP* da linhagem SS14 com agrupamento geográfico e diferenças em variantes de nucleotídeo único (SNPs) por linhagem *de TP* e geografia¹. Usando mais de 1.400 genomas de *TP* desses locais e em repositórios públicos, foram mapeados SNPs muito diferenciados para modelos de proteínas tridimensionais. Os resultados mostram substituições específicas da população, algumas em proteínas candidatas da membrana externa do vacinógeno (Vacinógenos) que foram encontradas em Países de baixa e média renda (por ex., Malawi), mas não em outros locais. Essas análises ressaltam a necessidade de mais amostras de genoma de *TP* de países africanos, asiáticos e sul-americanos, que não

foram bem representados ao longo do tempo (**Figura 1**), para avaliar as principais Vacinógenos de interesse.

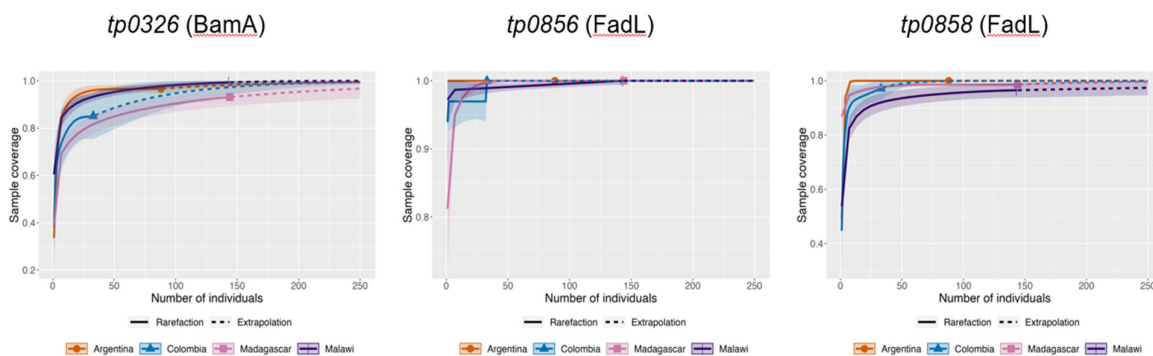
Figura 1 - Amostras de genoma do TPA por continente



Identificada a necessidade de ampliar o banco de dados disponíveis publicamente, está sendo proposta a coleta de amostras de sífilis em Países de baixa e média renda que não tenham sido amostrados anteriormente ou que tenham tido dados limitados de *TP* WGS reportados. A Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill (UNC-CH) propôs desenvolver e facilitar colaborações novas e contínuas com Brasil, na República Democrática do Congo (RDC), Índia, Libéria e Peru para definir melhor a diversidade genômica *do TP* entre pessoas com sífilis precoce.

Embora a amostragem escassa em locais globais possa limitar a capacidade de estimar tamanhos de amostra precisos necessários para identificar SNPs relevantes para a vacina, as curvas de rarefação (**Figura 2**) fornecem informações sobre o número de genomas necessários de diferentes localizações geográficas para entender a diversidade genética dos principais vacinógenos de interesse (por exemplo, Bam A e FADLs). Usando a rarefação para aproximar os tamanhos ideais de amostras em locais na África e América do Sul, a UNC-CH calculou que seria preciso gerar pelo menos 50 genomas por local para traçar o perfil adequado das principais vacinógenos de interesse. No entanto, os locais de estudo selecionados variaram em tamanho e população, e esse número depende do local e da variabilidade gênica da bactéria, não devendo ser visto como uma estimativa globalmente “uniformizada”.

Figura 2 - Curvas de rarefação



A UNC-CH, apoiada pela Fundação Gates, identificou outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) que contribuem para a úlcera genital no Malawi, além de *TP*. As análises de PCR identificaram *Haemophilus ducreyi*, vírus herpes simplex (HSV) e *Chlamydia trachomatis* em *swabs* de lesões genitais de amostras coletadas de participantes que se apresentaram na clínica de IST em Lilongwe. Foi identificada uma prevalência inesperadamente alta (23%) de sorovares de *H. ducreyi* e *C. trachomatis*, incomuns no Norte Global.² Recentemente, a Organização Mundial da Saúde anunciou uma epidemia nacional contínua de Mpox (clado I1b) na RDC e em outros países da África.³ A caracterização molecular dos patógenos da úlceras ano-genitais em outros países ajudaria a fundamentar o gerenciamento clínico e os regimes de tratamento sintomático, além de contribuir para os esforços de controle da sífilis e de outras ISTs em diferentes regiões.

A proposta do presente estudo, a coleta de amostras, procedimentos de processamento, protocolos de sequenciamento de última geração e testes de amplificação de ácidos nucleicos implementados servirão para ampliar o entendimento da variabilidade genética e do OMPeome de *TP* em escala global, bem como dos patógenos de ISTs que causam as úlceras ano-genitais. O WGS para *TP* usando diferentes tipos de amostras, incluindo esfregaços de lesões, esfregaços orofaríngeos e raspagens de pele, fornecerá a identificação de clados, subclados e variabilidade de *TP* associados a vacinógenos de interesse. O soro será coletado e armazenado para pesquisas futuras, incluindo o desenvolvimento de análises imunológicas, como ensaios baseados em esferas multiplexadas (por exemplo, Luminex, não descritos neste estudo), para ajudar na seleção de vacinógenos essenciais e refinar os ensaios de diagnóstico. Além disso, utilizaremos métodos de PCR usando esfregaços de lesões de pessoas que apresentam úlceras ano genitais para ajudar a determinar a prevalência de cancroide, Mpox e outras ISTs em locais clínicos localizados em Países de baixa e média renda com poucos ou nenhum dado de prevalência para nortear

seus algoritmos de gerenciamento clínico de ISTs. Esses dados contribuirão para o nosso conhecimento das etiologias das úlceras ano genitais na Clínica do Homem da AHF em Recife.

2 Objetivos

- 1) Descrever a diversidade genômica em cepas de *TP* coletadas de amostras biológicas de pessoas atendidas na Clínica do Homem da AHF, em Recife-Brasil
- 2) Determinar a prevalência de outras ISTs entre participantes com úlceras ano-genitais, com ou sem sífilis concomitante, na da Clínica no Homem da AHF, em Recife/PE-Brasil, usando métodos de detecção molecular.

3 Métodos

3.1 Desenho

Este será um estudo observacional de corte transversal, de participantes com sífilis primária, sífilis secundária, e outros tipos de úlceras ano- genitais (não sífilis) (**Figura 3**).

3.2 Local

Serão recrutados participantes para o estudo entre as pessoas que se apresentam rotineiramente para atendimento na **Clínica do Homem da AHF Brasil**. A entrevista, anamnese e exame físico, testes rápidos e coletas de qualquer exame laboratorial e amostras biológicas, bem como orientação, tratamento e seguimento clínico habitual, serão realizadas na própria Clínica do Homem da AHF Brasil.

O gerenciamento, processamento e análise de dados serão realizadas no Instituto de Saúde Global e Doenças Infecciosas da Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill (UNC-CH), Carolina do Norte. A análise genômica a partir das amostras coletas e processamento para realização de PCR de ISTs será realizado pelo Laboratório de Epidemiologia e Ecologia de Doenças Infecciosas (IDEEL) da UNC-CH, Instituto de Saúde Global e Doenças Infecciosas, UNC-CH. As amostras biológicas serão armazenadas em caráter temporário no LACEN-PE até finalização da inclusão de participantes e envio para a UNC-CH (freezer -80C), onde será realizado processamento das amostras para análises de PCR molecular para estudo genômico do *Treponema palidum* e ddiagnóstico de outras ISTs.

3.3 População com critérios de elegibilidade

Serão considerados elegíveis pessoas com idade a partir de 18 anos que se apresentarem à clínica de IST de Recife-AHF com sinais e sintomas compatíveis com sífilis primária ou secundária, ou outras úlceras ano-genitais suspeitas para ISTs. Esses participantes não deverão ter nenhum tratamento anterior para os sinais ou sintomas atuais de ISTs. Indivíduos com histórico de sífilis anterior (tratada), infecção por HIV ou gravidez não serão excluídos do estudo.

3.4 Critérios de inclusão

- 1 Idade \geq 18 anos;
- 2 Apresentar pelo menos uma das condições a seguir:
 - A. Sífilis primária suspeita caracterizada por uma ou mais lesões ulcerativas (por ex., cancro úmido); com microscopia de campo escuro positiva, ou teste de anticorpos não treponêmicos (por ex., RPR) ou treponêmicos reagente.
 - B. Sífilis secundária suspeita caracterizada por lesões mucocutâneas localizadas ou difusas (por ex., erupção cutânea - como lesões maculares não pruriginosas, maculopapulares, papulares ou pustulosas) com linfadenopatia generalizada, manchas mucosas e/ou condiloma lata; com teste de anticorpos não treponêmicos (por ex., RPR) ou treponêmicos reagente.
 - C. Outra doença ulcerosa ano-genital, com ou sem sífilis, caracterizada pela presença de lesões ulcerativas ou erosivas únicas ou múltiplas nas áreas genital, anal ou perianal.
- 3 Consentimento para participação, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorização de armazenagem e potencial uso de amostras biológicas com informação identificadora para outros estudos .

3.5 Critérios de não inclusão

1. O participante não entender o objetivo do estudo ou a natureza de sua participação.
2. Histórico de tratamento prévio para a condição atual nos últimos sete dias com antibióticos ativos contra a *sífilis* (ou seja, penicilinas, tetraciclina, macrolídeos, cefalosporinas, linezolida).

Pessoas que tenham recebido profilaxia pós-exposição com doxiciclina (Doxi Prep) ou que tenham um diagnóstico de IST concomitante suspeito ou confirmado, além da sífilis, no momento ou após a inscrição

(por exemplo, uretrite, vaginite, herpes genital, Mpox, gonorreia, clamídia) não serão excluídas do estudo. A infecção por HIV e gravidez não são critérios de exclusão.

O local estima a inscrição de 80 participantes com sífilis confirmada por microscopia de campo escuro, ou testes rápidos treponêmicos, ou testes laboratoriais não treponêmicos, bem como 80 casos de úlceras ano genitais em pessoas com sífilis descartada, para realização de testes adicionais de IST, em um período de 4 meses.

3.6 Procedimentos

3.6.1 Recrutamento

Os participantes com sinais/sintomas de sífilis primária ou secundária, ou úlceras ano-genitais, serão recrutados quando se apresentarem na Clínica do Homem, por livre demanda, para avaliação de rotina.

Caso um indivíduo seja considerado potencialmente elegível, a equipe do estudo o convidará para participar do estudo. Antes de qualquer procedimento, o participante potencial do estudo será esclarecido, para isso receberá uma descrição do estudo (objetivo e procedimentos do estudo) e será solicitado a ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorização de armazenagem e potencial uso de amostras biológicas com informação identificadora para outros estudos que alguém o leia para ele (ambos os termos estarão sob a sigla TCLE no restante do documento). O TCLE deve ser assinado antes da realização de qualquer procedimento de triagem ou estudo, uma cópia do TCLE ficará em posse do participante e outra ficará com a coordenação do estudo.

Avaliação e rastreo

Após a obtenção do TCLE por escrito, os participantes serão submetidos a anamnese e exame físico de rotina (Figura 3). Todas as pessoas com úlcera genital já terão sido avaliadas, diagnosticadas e prescritas para o diagnóstico sindrômico de úlcera ano-genital e/ou suspeita clínica de sífilis primária ou secundária de acordo com os procedimentos clínicos habituais da Clínica do Homem, seguindo as recomendações nacionais. Nenhuma intervenção dependerá do estudo, seguindo protocolos de rastreo, diagnóstico e tratamento habituais.

Apenas após essa avaliação é que serão encaminhados para potencial inclusão no estudo, e terão demais amostras biológicas e dados demográficos e de sinais e sintomas coletadas. Para o estudo, serão realizados teste rápido para sífilis treponêmico e não treponêmico, coleta de *swab* de úlceras, pele e mucosa – se presente, e região de orofaringe (apenas para pessoas com sífilis confirmada pelos testes treponêmico e/ou não treponêmico e/ou pesquisa de campo escuro) e coleta de sangue para realização

de RPR e demais avaliações da pesquisa.

Os participantes com úlceras ano-genitais com testes de triagem para sífilis negativos terão material de úlcera coletado para pesquisa de outras ISTs, em até 80 amostras. Para os 80 participantes com sífilis apontada por teste rápido reagente ou microscopia de campo escuro, amostras adicionais serão coletadas, incluindo esfregaços orofaríngeos, raspagens de pele e soro para fins de pesquisa (Objetivo 1) antes do tratamento para sífilis (vide sessão 3.6 - Procedimentos).

A coleta de amostras de pesquisa para participantes com sífilis (*consulte o Anexo X - Procedimentos para coleta de amostras de pesquisa clínica*) será realizada antes do tratamento da sífilis.

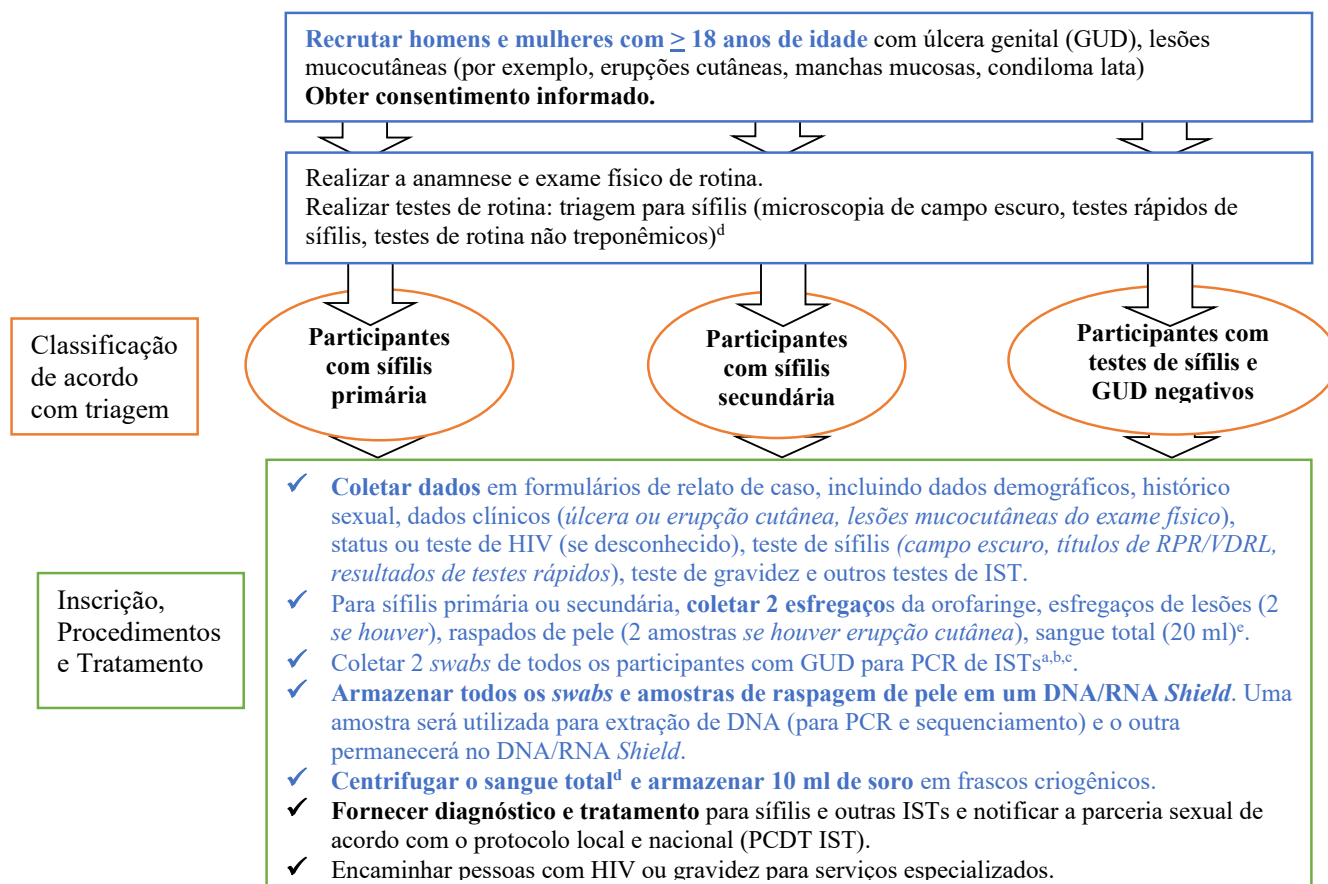
3.6.2 Inscrição

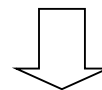
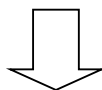
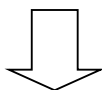
Todos os participantes que apresentem os critérios de inclusão serão submetidos pela equipe da Clínica do Homem à anamnese e exame físico habituais, registrando ainda os dados necessários para o protocolo. Nesse momento haverá decisão quanto à inclusão na pesquisa e posterior registro em prontuário médico

habitual, além do registro no RedCap – identificado pelo PIN.

Antes da
inclusão

Figura 3 - Esquema do projeto do estudo para coleta prospectiva de amostras





Legenda: procedimentos da pesquisa sinalizados em azul.

^aDois *swabs* serão coletados de todos os participantes incluídos com úlceras ano genitais, o que inclui participantes com ou sem sífilis, para teste de PCR de IST.

^bVide Anexo X - Procedimentos para coleta de amostras de pesquisa clínica

^cTodos os participantes com sífilis primária ou secundária, ou GUD sem sífilis, terão coleta de dados nos formulários de relato de caso.

^dTodas as pessoas sexualmente ativas que procuram a Clínica do Homem da AHF são rastreadas quanto a sinais e sintomas de ISTs e recebem oferta para realização de testagem rápida para sífilis e ao HIV. A clínica oferece de rotina diagnóstico e tratamento sintomático para as demais ISTs, de acordo com as necessidades individuais dos indivíduos, independentemente da participação no estudo.

^eO sangue deve ser centrifugado a 1.000-2.000 x g por 10 minutos.

^fTodas as amostras serão enviadas para a Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill (UNC-CH), nos Estados Unidos (EUA). Todas as amostras de *swab* residuais após as análises serão armazenadas no UNC-CH, e as amostras de soro serão armazenadas no Centro Médico Infantil de Connecticut, nos EUA, para uso futuro.

3.7 Registro dos dados e formulários de pesquisa

Os dados serão coletados em Formulários Clínicos de Pesquisa (CRFs) (*consulte os Anexos II a IX*) ou diretamente em um banco de dados REDCap. Os dados coletados em CRFs impressos serão inseridos no banco de dados eletrônico em até três (3) dias úteis após a inscrição. Os CRFs serão revisados para coletar características demográficas adicionais (*ou seja, idade, sexo no nascimento, gênero, país de residência*); número e gênero dos parceiros sexuais nos últimos três (3) meses; histórico de sífilis e outras ISTs; histórico médico (*ou seja, HIV, gravidez atual*).

Os dados clínicos serão coletados em entrevista com o participante e a partir dos prontuários médicos e documentados nos CRFs, incluindo sintomas (*ou seja, úlcera genital ou perianal, erupção cutânea, lesões orais*) e achados do exame físico (*ou seja, tamanho, número e localização das lesões da úlcera genital*); *tipo e distribuição da erupção cutânea, manchas mucosas, condiloma lata*), sífilis e outros diagnósticos e tratamentos. Os dados dos testes laboratoriais também serão coletados dos prontuários médicos, incluindo os resultados do teste de triagem de sífilis, o título de anticorpos não treponêmicos e os resultados do teste de anticorpos treponêmicos; gravidez (para mulheres); outros resultados de testes de IST e HIV.

Repositório de dados clínicos (REDCap)
Laboratórios do Núcleo de Genômica do UNC-CH^f (*swabs, raspagens de pele*) para armazenamento de *swabs* residuais e soro para uso futuro^d

3.8 Tratamento das ISTs

O tratamento para sífilis e outras ISTs, o encaminhamento para tratamento de HIV, conforme necessário, o aconselhamento sobre abstinência sexual e uso de preservativos, e o apoio para notificação das parcerias sexuais, serão fornecidos de acordo com os padrões de cuidado na Clínica do Homem, e de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Cuidado Integral das Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (PCDT IST), do Ministério da Saúde do Brasil⁶.

Não haverá modificações do cuidado habitual a partir dos testes do estudo, e não há previsão de visita de acompanhamento para o estudo após a inclusão, apenas seguimento clínico habitual conforme rotina da Clínica do Homem.

4 Métodos Laboratoriais e armazenamento de amostras

Os testes rápidos de diagnóstico de HIV e rastreio de sífilis serão realizados localmente de acordo com fluxo habitual previsto para os usuários da Clínica do Homem, e de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil⁶.

As amostras de pesquisa coletadas dos participantes do estudo incluirão dois esfregaços de úlcera genital para todos os participantes, além de dois esfregaços orofaríngeos, duas raspagens de pele (*se houver erupção cutânea*), dois esfregaços de outras lesões (*se houver lesão mucocutânea*) e 20 ml de sangue total (*10 ml de soro*) para os participantes incluídos com diagnóstico de sífilis (*Anexo 10 - Procedimentos para coleta de amostras de pesquisa clínica*).

Todas as amostras serão armazenadas na própria Clínica do Homem por até 24 horas, quando serão transferidas para o freezer -80C do LACEN-PE, onde serão armazenadas em caixas criogênicas próprias até transferência para a UNC-CH.

4.1 Quantificação de DNA por PCR

A Clínica do Homem enviará as amostras para o Núcleo de Genômica da UNC-CH para extração de DNA a partir de *swabs* de úlceras genitais, *swabs* de orofaringe, *swabs* de lesões, raspagens de pele coletadas de participantes com lesões sífilíticas usando um POP de laboratório.

O DNA será extraído das amostras no Núcleo de Genômica do UNC-CH. As PCRs quantitativas de *TP polA* (qPCR) serão realizadas no Núcleo de Genômica do UNC-CH, usando um protocolo padronizado para garantir resultados comparáveis. A quantificação da carga de *T. pallidum* nas amostras será feita por qPCR usando ensaios TaqMan para *polA* (*tp1021*) de acordo com os POPs estabelecidos e

usados rotineiramente no Núcleo de Genômica. Além disso, **o soro será coletado e armazenado no Centro Médico Infantil de Connecticut** para pesquisas futuras, incluindo o desenvolvimento de análises imunológicas, como ensaios baseados em esferas multiplexadas (por exemplo, Luminex, não descritos neste estudo), para ajudar na seleção de vacinógenos essenciais e refinar os ensaios de diagnóstico.

4.1.1 Sequenciamento do genoma do *T. pallidum*

O WGS será realizado após o enriquecimento para *TP* usando a captura híbrida de acordo com os protocolos estabelecidos e utilizados rotineiramente no UNC-CH.¹ Todas as tentativas serão realizadas para gerar genomas completos diretamente de amostras clínicas, embora as amostras com baixa concentração de DNA e/ou DNA de *high background* (hospedeiro, bactérias comensais da pele) possam ser excluídas dos esforços de sequenciamento se um resultado de alta qualidade não for obtido.

Além disso, o Núcleo de Genômica trabalhará em conjunto para preencher os hiatos identificados em genes OMP conhecidos e putativos usando uma combinação de abordagens de bioinformática (por exemplo, revisão manual de leituras de alta qualidade e não duplicadas, montagem de alvos candidatos de *novo*) e de laboratório (por exemplo, PCR e sequenciamento de amplicon de *loci* específicos).

Para os esforços de sequenciamento de genoma completo e direcionado, os dados brutos de sequenciamento serão disponibilizados publicamente por meio dos bancos de dados do NIH *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), como o Arquivo de Leitura de Sequência.

4.1.2 Análises de OMP do *T. pallidum*

As sequências de DNA e aminoácidos de genes conhecidos de proteínas da membrana externa serão extraídas e traduzidas, respectivamente. A variabilidade da sequência será mapeada para estruturas de proteínas previstas via Chimera, principalmente para candidatos a vacinógenos (por exemplo, Bam A, FadLs), usando modelos estruturais previstos publicados e AlphaFold3 para localizar variantes em todas as Vacinógenos conhecidas e putativas e seus loops extracelulares (ECLs), com exceção dos membros da família Tpr para os quais não existem estruturas previstas de alta confiança.

4.1.3 PCR para úlceras genitais

A PCR será realizada para determinar a presença de outras ISTs associadas a úlceras ano-genitais (por exemplo, *T. pallidum*, HSV, cancroide, *C. trachomatis* e Mpox). Para amostras identificados com *C. trachomatis*, os sorovares conhecidos por causar linfogranuloma venéreo (LGV) serão identificados. Um

protocolo comum de PCR será desenvolvido a partir daqueles já utilizados pelos laboratórios de pesquisa e da literatura publicada, e aplicado às amostras de DNA recebidas pelo Núcleo de Genômica do UNCH. Para amostras negativas em todos os ensaios de PCR, o sequenciamento direcionado do gene 16S rRNA bacteriano será realizado.

4.2 Teste rápido treponêmico e não treponêmico para sífilis combinado (Chembio)

O teste rápido combinado para a detecção de sífilis integra simultaneamente a avaliação de anticorpos treponêmicos e não treponêmicos, proporcionando um diagnóstico mais eficiente da infecção. Este tipo de teste, como o que será utilizado da ChemBio, utiliza antígenos específicos de *Treponema pallidum* para detectar anticorpos IgG e IgM (treponêmicos) e, ao mesmo tempo, identifica a presença de anticorpos não específicos associados à infecção (não treponêmicos).

O procedimento seguirá as instruções do fabricante, inicia-se com a coleta de uma amostra de sangue venoso ou capilar, que é aplicada na plataforma do teste. Após a adição do diluente e observado o tempo de reação, a leitura dos resultados por observação da formação de linhas coloridas indicando a presença dos anticorpos: uma linha de controle confirma o funcionamento do teste, enquanto a presença da linha correspondente ao teste treponêmico e não treponêmico sinaliza um resultado positivo.

A vantagem do teste combinado reside na sua capacidade de fornecer informações complementares sobre a fase da infecção. A detecção de anticorpos treponêmicos sugere uma infecção ativa ou passada, enquanto a presença de anticorpos não treponêmicos pode indicar uma infecção em andamento, além de ser útil para o monitoramento da resposta ao tratamento. A interpretação dos resultados deve ser cuidadosa, levando em consideração o histórico clínico do paciente, pois pode haver casos de resultados falso-positivos ou falso-negativos, quando utilizados isoladamente. Assim, a utilização do teste combinado se apresenta como uma abordagem eficiente e prática no manejo da sífilis.

Esse teste será utilizado apenas para definição de diagnóstico de sífilis para inclusão no estudo, e não para conduta clínica (eu seguirá manejo habitual com teste rápido treponêmico fornecido pelo Ministério da Saúde e teste não treponêmico laboratorial habitual).

4.3 Pesquisa de *Treponema* por campo escuro

A microscopia de campo escuro é uma técnica auxiliar fundamental na pesquisa de sífilis, que permite a visualização direta de *Treponema pallidum*, o agente etiológico da doença. O procedimento inicia com a coleta de uma amostra biológica, que pode ser derivada de lesões primárias (cancro duro) ou de secreções exsudativas. A amostra é preparada em uma lâmina de microscópio, na qual uma pequena

quantidade do material é distribuída de forma uniforme. Para realizar a observação, um microscópio de campo escuro é utilizado, o qual é equipado com um condensador especial que permite a passagem de luz oblíqua, criando um contraste que faz com que os treponemas apareçam como organismos brilhantes em seu movimento peculiar em um fundo escuro.

Durante a análise, é crucial ajustar o foco e a iluminação para otimizar a visualização dos treponemas. A identificação de *Treponema pallidum* é baseada em suas características morfológicas, como a forma espiralada e o movimento em "zigue-zague", que são distintivos deste patógeno. Embora a microscopia de campo escuro seja uma técnica rápida e direta, é importante notar que a interpretação deve ser realizada por profissionais experientes, uma vez que o método pode apresentar limitações em termos de sensibilidade e especificidade. Desse modo, a microscopia de campo escuro é frequentemente utilizada em conjunto com outros testes sorológicos para confirmação do diagnóstico de sífilis.

Um pequeno laboratório, bem como contratação de técnico de laboratório, está sendo preparado na Clínica do Homem, para realização do exame no local e será incluído no fluxo rotineiro na clínica.

4.4 Exame quantitativo de sífilis por VDRL

O exame VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) é um teste não treponêmico de floculação amplamente utilizado na triagem para sífilis, que detecta a presença de anticorpos reativos no soro de pacientes. O procedimento inicia-se com a coleta de uma amostra de sangue venoso, que é posteriormente processada para separar o soro. Em seguida, uma alíquota do soro é misturada com um antígeno não treponêmico que contém cardiolipina, lecitina e colesterol em uma placa de VDRL, com anéis de 12mm de diâmetro. A mistura é agitada a 180 rpm em agitador orbital por 4 minutos, em ambiente com temperatura entre 23 e 29 °C, em seguida é lida em microscópio de campo claro.

A presença de floculação indica uma reação positiva, sugerindo a possível presença de sífilis. A interpretação dos resultados deve ser feita considerando não apenas a reatividade do teste, mas também a história clínica do paciente, uma vez que o VDRL pode apresentar reatividade em outras condições patológicas, como doenças autoimunes e infecções virais.

Um pequeno laboratório, bem como contratação de técnico de laboratório, está sendo preparado na Clínica do Homem, para realização do exame no local, que será também rotineiro.

4.5 Etiquetagem, armazenamento e envio de amostras

As amostras do estudo serão etiquetadas com um número de identificação exclusivo do participante. Para o rastreamento de amostras, o UNC-CH fornecerá etiquetas pré-impressas ao local de coleta com código de barras de identificação com um código exclusivo legível por humanos e PINs exclusivos designados para cada CRS. No caso de CRFs impressos utilizados para coletar dados dos participantes, uma dessas etiquetas será afixada no CRF para indicar a identidade do participante, e isso pode ser usado para registrar as informações no banco de dados REDCap do estudo. Etiquetas adicionais serão afixadas nos tubos de amostras primárias e vinculadas ao PIN por meio do CRF.

As amostras obtidas em cada visita serão preservadas em DNA/RNA *Shield* (Zymo Research) para ensaios subsequentes de TaqMan qPCR visando determinar as cargas de *TP*. Todas as amostras em DNA/RNA *Shield* e amostras de soro serão armazenadas a -80°C no LACEN-PE até o envio para o Núcleo de Genômica do UNC. As amostras serão rastreadas por meio de registros de coleta e de remessa nos locais de pesquisa clínica e posteriormente inventariadas no UNC-CH.

O envio de amostras para o Núcleo de Genômica do UNC-CH seguirá os requisitos para manter a qualidade e integridade das amostras com monitoramento de temperatura, conforme necessário. Todas as remessas internacionais de amostras estarão em conformidade com a IATA.

Após as análises das amostras nos Núcleos de Genômica para o sequenciamento do genoma do *TP*, todas as amostras serão mantidas armazenadas, se permitido pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) dos respectivos países e pelos termos de consentimento livres e esclarecidos individuais (TCLE). Para o armazenamento de amostras a longo prazo no UNC-CH, todas elas serão armazenadas sob a condição apropriada (-80°C ou LN₂) em unidades monitoradas continuamente. As amostras de soro serão enviadas do UNC-CH para o Centro Infantil de Connecticut para futuras análises imunológicas.

5 Plano de Análise e principais variáveis

5.1 Análises das características dos participantes

As estatísticas descritivas padrão serão utilizadas para descrever as características dos participantes em geral. Estatísticas resumidas, como médias, medianas, desvios padrão e intervalos, serão produzidas para variáveis contínuas. As frequências serão tabuladas para variáveis categóricas e ordinais.

O número de participantes inscritos será tabulado por grupo (por exemplo, homens/mulheres heterossexuais, HSH, infectados pelo HIV, mulheres grávidas). Criaremos tabelas com as variáveis relevantes (sexo, idade, estágio da sífilis etc.) e usaremos estatísticas descritivas para descrever as

características dos participantes que forneceram amostras ao biobanco de amostras de sífilis (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Objetivo, resultado esperado e métodos de análise

Objetivos	Resultado primário	Estatísticas descritivas
Objetivo 1	Dados demográficos, clínicos e laboratoriais	Frequências de variáveis (por exemplo, idade [mediana], sexo [masculino ou feminino], país [com base no CRS], estágio da sífilis [primária ou secundária], HIV [positivo ou negativo], gravidez, títulos não treponêmicos [mediana]) entre os participantes.
Objetivo 1	Genoma, clado e subclados de <i>TP</i>	Número de clados de <i>TP</i> Nichols- vs SS-14 identificados a partir de participantes únicos do estudo Tipo e proporção de subclasses de <i>TP</i> identificados em participantes únicos Frequência de clados ou subclados com base nos dados demográficos, clínicos ou laboratoriais dos participantes
Objetivo 1	Variantes de OMP	Número de variantes nas sequências do genoma do <i>TP</i> associadas a Vacinógenos Tipo e proporção das principais variantes de OMP
Objetivo 2	Prevalência de patógenos de ISTs entre os casos de úlceras ano genitais	Número de amostras com <i>TP</i> , <i>H. ducreyi</i> , HSV, sorovares de <i>C. trachomatis</i> e Mpox Proporção de participantes com essas infecções e coinfeções Frequência de patógenos de ISTs com base nos dados demográficos, clínicos ou laboratoriais dos participantes
Objetivo 2	Outros patógenos identificados a partir de patógenos de úlceras ano genitais por sequenciamento de 16s rRNA	Tipo e número de outros agentes patogênicos bacterianos

5.2 Análises dos genomas de *T. pallidum*

Aproximadamente 50 novos genomas da Clínica do Homem da AHF em Recife-PE, que não foram bem representados na literatura, serão gerados e analisados usando uma versão aprimorada do nosso fluxo de bioinformática estabelecido⁵ que incorpora identificadores moleculares exclusivos que são introduzidos durante a captura da isca de RNA para correção de erros. Essa abordagem permitirá a identificação de variantes de alta qualidade que não haviam sido incorporadas anteriormente nas análises genômicas da bactéria *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*.

A análise filogenômica será realizada para determinar as atribuições de clado e subclado e identificar variantes em genes que codificam candidatos a vacinógenos.

Os dados brutos de sequenciamento serão depositados em bancos de dados disponíveis publicamente, como o Arquivo de Leitura de Sequência do NCBI. A remoção de dados genéticos humanos ocorrerá por meio do enriquecimento do DNA *TP* usando captura híbrida antes do sequenciamento e pela remoção bioinformática de leituras de sequenciamento humano antes da inclusão em bancos de dados públicos.

5.3 Análises de patógenos das úlceras ano genitais

Outros patógenos causadores de úlceras ano genitais serão identificados por PCR. Para as amostras negativas em todos os ensaios de PCR, será realizado o sequenciamento de 16S rRNA e os dados serão analisados com o QIIME 2 para identificação de spp. bacterianas no nível de gênero, bem como o cálculo de métricas de diversidade bacteriana. Esses testes são apenas para pesquisa e não serão fornecidos aos locais para ajudar no gerenciamento clínico, pois há desafios de testes e validação em “tempo real” para a tomada de decisões clínicas. Os resultados serão mensurados pelo número de amostras com dados de PCR de IST e obtidos por meio de análises de patógenos com base nas características dos participantes, com foco especial na presença ou ausência de *H. ducreyi* e Mpox entre outros casos de úlceras ano genitais (**Quadro 1**).

6 Riscos e benefícios potenciais

Os riscos de participação no estudo são mínimos e estão relacionados aos procedimentos do estudo. O exame físico e as anamneses serão realizados em locais privados e confidenciais da clínica; no entanto, esses procedimentos e algumas das perguntas feitas podem causar algum desconforto físico e emocional, respectivamente. As mesmas precauções para a coleta de amostras serão aplicadas na realização dos procedimentos em um local privado para proteger a confidencialidade do paciente.

A coleta de sangue (até 20 ml para soro) pode causar dor, sangramento ou hematoma em caso de dificuldade de encontrar a veia, no local da flebotomia, além de tontura ou desmaio. Para reduzir o risco de infecção, uma técnica asséptica no local da flebotomia será utilizada. A coleta de esfregaços de úlceras genitais ou de outras lesões pode causar dor e sangramento, e os *swabs* da orofaringe podem causar algum desconforto. Se houver lesões secundárias de sífilis, os médicos do estudo farão uma raspagem da pele usando uma lâmina de língua. Esse procedimento pode causar um leve desconforto, mas sem sangramento. Para reduzir os riscos, a raspagem da pele será realizada usando técnicas assépticas e seguindo um POP (*consulte o Anexo X - Procedimentos para coleta de amostras de pesquisa clínica*).

A flebotomia para coleta de soro e a raspagem de pele será realizada utilizando técnicas assépticas. Os *swabs* de exsudato das lesões genitais/perianais serão obtidos com *swabs* estéreis. Os possíveis riscos desses procedimentos menores serão minimizados com a coleta de uma anamnese cuidadosa de reações alérgicas e distúrbios hemorrágicos anteriores e realização dos procedimentos por uma equipe de estudo treinada e experiente em cada centro clínico.

Não haverá benefícios diretos para os participantes do estudo. No entanto, a relação risco-benefício é favorável, considerando o risco mínimo dos procedimentos a serem realizados e a quantidade de novas informações a serem obtidas, que podem fundamentar o desenvolvimento da vacina contra a sífilis e os futuros diagnósticos de IST das úlceras ano genitais.

A ocorrência de eventos adversos e eventos adversos graves não é esperada pelo tipo de estudo. No entanto, caso ocorram eventos adversos graves, eles são notificados ao Comitê de Ética em Pesquisa.

7 Resultados Esperados

O resultado primário do Objetivo 1 é a geração de aproximadamente 30-50 novos genomas de *TP* da Clínica do Homem da AHF, em Recife/PE, juntamente com os metadados que acompanham os participantes com sífilis primária e secundária inscritos em cada área (**Quadro 1**). Todos os genomas das cepas das linhagens Nichols e SS14 serão avaliados quanto à sua variabilidade genômica em cada área geográfica, por meio da análise de variantes nos principais Vacinógenos (antígenos não Tpr), de dados coletados pelos demais centros do estudo internacional.

O resultado primário do Objetivo 2 é a prevalência (número de participantes com qualquer amostra positiva/número de participantes únicos com amostras testadas) de patógenos de ISTs (*TP*, *H. ducreyi*, HSV, sorovares de *C. trachomatis* e Mpox) entre as amostras de úlceras ano genitais dos participantes inscritos no Objetivo 1. Outros resultados do Objetivo 2 serão a detecção de quaisquer outros patógenos identificados por análises de sequenciamento do rRNA 16s em amostras de úlceras ano-genitais com resultados negativos de PCR.

8 Aspectos éticos

Os investigadores principais e os co-investigadores garantirão que este estudo seja realizado em total conformidade com os princípios do Relatório Belmont - Princípios Éticos e Diretrizes para a Proteção de Seres Humanos de Pesquisa da Comissão Nacional para a Proteção de Seres Humanos de Pesquisa

Biomédica e Comportamental (18 de abril de 1979) e codificado em 45 CFR 46, 21 CFR 50 e 56 e ICH E6; 62 Regulamentações Federais 25691 (1997), se aplicável. Também serão observadas as recomendações e legislações do Sistema CEP/CONEP, especialmente as Resoluções CNS 466/2012 e CNS 441/2011.

8.1 Processo para obtenção do consentimento informado livre e esclarecido

O consentimento informado livre e esclarecido é um processo que é iniciado antes de um indivíduo concordar em participar de um estudo e que continua durante toda a sua participação no estudo. A equipe da Clínica do Homem será treinada para oferta de inclusão dos participantes no estudo e sobre o processo para obtenção do consentimento informado livre e esclarecido.

Um TCLE que descreve detalhadamente os procedimentos do estudo, os riscos e possíveis benefícios será fornecido aos participantes do estudo. Após a análise do documento apropriado, os pesquisadores do local (ou pessoa designada) explicarão o estudo de pesquisa aos participantes e responderão a quaisquer perguntas que possam surgir. Os participantes do estudo devem assinar o TCLE, e a documentação por escrito do processo de consentimento informado será necessária antes do início de quaisquer procedimentos/intervenções do estudo que estejam sendo feitos especificamente para o estudo. Os participantes do estudo receberão uma cópia do TCLE assinada.

Também será fornecido termo específico para autorização de uso posterior das amostras biológicas em estudos subsequentes (item 8.3).

Todos os participantes poderão declinar da participação no estudo a qualquer momento, e terão dados excluídos dos bancos de dados, bem como amostras remanescentes descartadas.

8.2 Confidencialidade do participante

Os participantes do estudo terão números identificadores (PINs) e não serão identificados pelo nome do ponto de vista do protocolo de pesquisa. Essa confidencialidade é estendida para cobrir testes de amostras biológicas, além das informações clínicas relacionadas aos participantes do estudo.

O protocolo do estudo, a documentação, os dados e todas as demais informações geradas serão mantidos em sigilo absoluto. Nenhuma informação relativa ao estudo ou aos dados será divulgada a terceiros não autorizados sem a aprovação prévia por escrito do patrocinador e do participante.

8.3 Uso futuro de amostras armazenadas

Como parte do protocolo de estudo, os participantes darão o consentimento para que sejam armazenados produtos adicionais de amostras biológicas coletadas durante o estudo (ou seja, amostras de *swab*, soro) para testes futuros relacionados aos objetivos deste protocolo. Se o participante consentir com o armazenamento e uso futuro das amostras, as amostras identificadas com PINs serão armazenadas no UNC-CH (amostras de *swab*) e no Centro Infantil de Connecticut (soro). Testes futuros em amostras só ocorrerão na medida em que forem autorizados no TCLE de cada centro de estudo ou conforme autorizado de outra forma pela legislação aplicável, e após análise e aprovação do patrocinador e do Comitê de Ética do pesquisador que solicitar as amostras.

As amostras arquivadas serão identificadas apenas pelo PIN, o que permitirá a sua vinculação aos dados do estudo, mas não a nenhum identificador pessoal. As amostras dos participantes do estudo serão mantidas até que sejam usadas ou destruídas. Caso um participante do estudo decidir, a qualquer momento, que não deseja que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras, ele deverá entrar em contato com a equipe do estudo, que notificará a equipe do laboratório/arquivo de amostras, que por sua vez marcará as amostras com uma etiqueta “destruir”. As amostras marcadas serão removidas do armazenamento e destruídas o mais rápido possível.

8.4 Manuseio de dados e manutenção de registros

Os identificadores diretos de participantes, como nomes e datas de nascimento, serão mantidos em sigilo na medida do que for legalmente possível e serão mantidos em armários de arquivos médicos e em servidores criptografados seguros. Somente as equipes do estudo terão acesso aos formulários contendo informações exclusivas do paciente, como registros de admissão e Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os formulários de relato de caso e todos os outros documentos do estudo terão números de identificação do participante (PIN), e os dados serão inseridos em um banco de dados eletrônico no REDCap, que estará em conformidade com a HIPAA e será protegido pelo firewall de tecnologia da Internet da UNC-CH. O acesso será restrito à equipe do estudo usando computadores seguros e protegidos por senha. As fotografias das lesões ou erupções cutâneas dos participantes não incluirão nenhuma característica de identificação.

8.5 Responsabilidades pelo gerenciamento de dados

Os pesquisadores da Clínica do Homem serão responsáveis por garantir a precisão, integridade, legibilidade e pontualidade dos dados reportados. Os formulários de coleta de dados referentes aos

critérios de elegibilidade serão utilizados como documentos de origem dos CRFs e registrados e mantidos para cada participante inscrito no estudo. Todos os demais formulários de coleta de dados deverão ser preenchidos de maneira clara e legível para garantir a interpretação precisa dos dados. Será necessário usar tinta preta ou azul para garantir a clareza das cópias reproduzidas. Ao fazer uma mudança ou correção, a equipe do estudo riscará o registro original com uma única linha, rubricará e datará a alteração, e não apagará, sobrescreverá ou usará líquido corretivo ou fita corretiva no original. Os dados informados nos CRFs devem ser consistentes com os documentos de origem, ou as discrepâncias devem ser explicadas.

Todos os CRFs e relatórios laboratoriais devem ser revisados pela equipe clínica e pelo pessoal de entrada de dados, que garantirão que eles sejam precisos e completos antes de enviá-los ao servidor do REDCap. A coleta de dados é de responsabilidade da equipe da Clínica do Homem, sob a supervisão da Dra. Fernanda Fernandes Fonseca. Durante o estudo, os pesquisadores da Clínica do Homem devem manter a documentação completa e precisa do estudo.

A equipe da UNC-CH será responsável pelo gerenciamento de dados, revisão de qualidade, análise e relatório dos dados do estudo no REDCap. O UNC-CH desenvolverá um banco de dados para o estudo que estará em conformidade com as diretrizes aplicáveis de GCP.

8.6 Fontes de dados

Os prontuários médicos e de pesquisa serão mantidos em locais seguros e apropriados para este estudo, de acordo com os requisitos regulamentares e institucionais para a proteção da confidencialidade dos participantes. Dados de origem são todas as informações, registros originais de achados clínicos, observações ou outras atividades necessárias para a reconstrução e avaliação deste estudo.

8.7 Retenção de registros do estudo

Os registros e documentos relativos à condução deste estudo, incluindo formulários de coleta de dados, documentos de origem, TCLEs e resultados de testes laboratoriais, deverão ser mantidos pelo pesquisador por pelo menos 5 anos após a conclusão deste estudo. Nenhum registro poderá ser destruído sem a permissão por escrito do patrocinador.

9 Controle de Qualidade

A UNC-CH implementará procedimentos de controle de qualidade (QC), começando com o sistema de

entrada de dados no REDCap e gerará verificações de QC de dados que serão executadas no banco de dados. A construção do banco de dados REDCap requer a criação de um dicionário de dados, e as informações faltantes são sinalizadas claramente por meio de um painel de destaque. Todos os dados faltantes ou anomalias de dados serão comunicados ao(s) local(is) para esclarecimento e resolução. Os motivos para a falta de valores de dados e desistências de participantes serão documentados no banco de dados.

Os dados do REDCap serão baixados semanalmente e verificações de garantia de qualidade (QA) serão realizadas. Os registros dos participantes serão verificados quanto à integridade e valores ilógicos. Relatórios de controle de qualidade específicos do local serão gerados com base nas consultas realizadas e fornecidos aos gerentes de dados de cada local. Todas as dúvidas serão abordadas localmente e os registros do REDCap serão corrigidos, conforme aplicável. Relatórios resumidos de acompanhamento das inscrições no estudo serão gerados mensalmente e apresentados à equipe do estudo. Toda a agregação e análise de dados serão realizadas usando o R v.4.0 (Viena, Áustria).

10 Disseminação

Os resultados serão difundidos por meio de reuniões virtuais organizadas pela AHF Brasil, com ampla divulgação eletrônica. Serão ainda elaborados posters e artigos científicos para divulgação dos resultados encontrados mais relevantes.

Também serão apresentados, oralmente, os resultados na Clínica do Homem, com amplo convite à comunidade acadêmica de Recife e aos participantes do estudo e pacientes da clínica.

11 Cronograma

Quadro 2 - Cronograma simplificado

DATA	ATIVIDADE	OBSERVAÇÕES
2024	Elaboração de documentos do protocolo e submissão para edital de financiamento da Fundação Bill e Melinda Gates	Etapa concluída
2024	Submissão do projeto de pesquisa para aprovação por Comitê de Ética da UNC-CH	Etapa concluída
2024	Assinatura de contrato de parceria AHF e UNC-CH	Etapa concluída
01-02/2025	Tradução e adequação do protocolo de estudo para a Clínica do Homem da AHF	Etapa concluída
04/2025	Submissão do Comitê de Ética e Pesquisa via Plataforma Brasil	Em andamento
11/2025	Entrada dos formulários no RedCap	Etapa concluída

11/2025	Contratação de pessoal	Etapa concluída
05/2025	Recebimento dos insumos de pesquisa e aquisição de materiais necessários	Etapa concluída
01/2026	Visita para treinamento da equipe	Após aprovação do CONEP
02/2026	Início do recrutamento	Após aprovação do CONEP
10/2025-07/2026	Visitas mensais de monitoramento	Em andamento
07/2026	Previsão de término de recrutamento e revisão de resultados epidemiológicos preliminares.	Após aprovação do CONEP
12/2026	Relatório com resultados preliminares para divulgação institucional e produção de documentos científicos	Após aprovação do CONEP
12/2026	Publicação com resultados do sítio da AHF Brasil	

Um relatório final será preparado após a disponibilidade de todos os dados clínicos e laboratoriais. Relatórios estatísticos intermediários podem ser gerados conforme necessário. A Clínica do Homem poderá solicitar informações para compartilhar com os participantes do estudo de acordo com as respectivas diretrizes do Comitê de Ética.

12 Orçamento (Quadro resumo 3)

12.1 Pessoal

Fernanda Fernandes Fonseca, AHF Global, pesquisadora principal - Nível de esforço de 25%. Fernanda supervisionará a implementação geral e a direção estratégica do projeto. A AHF contribuirá com 100% do tempo e do salário do co-investigador necessários para este projeto.

Adele Schwartz Benzaken, AHF Global, co-investigadora - Nível de esforço 25%. Adele gerenciará todos os aspectos do projeto e trabalhará junto com a co-investigadora do projeto para garantir que o projeto seja entregue com custo, qualidade e prazo. A AHF contribuirá com 100% do tempo e do salário do Investigador Principal necessários para esse projeto.

Maria Luiza Bazzo - Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia - LBMMS, Universidade Federal de Santa Catarina, co-investigadora. Nível de esforço 10%. Consultora e retaguarda de laboratório no Brasil. Treinamento de equipes para testagens, coletas e transporte de amostras.

Médicos, Enfermeiros, Aconselhadores, Farmacêutico da AHF da Clínica do Homem de Recife, equipe técnica - nível de esforço 25%. Realizarão a triagem e inclusão de pacientes, e execução do protocolo do estudo. A AHF contribuirá com 100% do tempo e do salário do co-investigador necessários para este projeto.

Enfermeiro e o técnico de laboratório em tempo integral envolvidos no projeto por 40 horas por semana cada, equipe técnica - Nível de esforço 100%. O técnico de laboratório e a enfermeira coletarão e processarão as amostras necessárias, e a enfermeira explicará o protocolo do estudo e coletará a assinatura do acordo ético do estudo, além de coleta de dados do prontuário e inclusão de dados no RedCap. A bolsa do estudo financiará 100% do salário.

12.2 Viagens

As despesas de viagem cobrem os custos de transporte, hospedagem e subsistência do pessoal que precisa viajar para atividades relacionadas ao projeto. Estima o custo de um total de 5 viagens de Manaus e Salvador para Recife.

12.3 Materiais e suprimentos

Os materiais e suprimentos abrangem todos os itens tangíveis necessários para a execução do projeto. As necessidades estimadas incluem a aquisição de agitador de amostras múltiplas de laboratório, microscopia de campo escuro, recursos de microscopia de campo escuro, PCRs de sífilis, 400 VDRL/RPR (diagnóstico e monitoramento), *swabs*, kits de coleta de sangue, kits de proteção de DNA, tablet - acesso ao RedCap.

Os custos são estimados com base em dados históricos e cotações de fornecedores.

A licença de operação da clínica está sendo atualizada para incluir adaptações arquitetônicas para garantir a conformidade com as normas de segurança, conforme exigido pelas mudanças na legislação de Pernambuco.

12.4 Incentivo ao paciente

Todos os custos do participante e seus acompanhantes, relacionados ao estudo, serão ressarcidos. Esses são os fundos alocados para cobrir meia diária de trabalho baseada no salário mínimo, e transporte público de ida e volta, para os 180 participantes estimados no estudo.

12.5 Impressão

Cobre o custo de impressão dos materiais informativos e dos formulários de consentimento.

12.6 Custos indiretos administrativos

São estimados em 15% do custo direto do projeto. Eles cobrirão parte do suporte administrativo necessário para implementar o projeto.

Quadro 3 - Orçamento estimado original

ITEM	QTY (80 participants)	Year 1	Year 2	Total
PERSONNEL:				
TBN - Nurse 40hrs/week (Scholarship)	1	\$ 22,320	\$ 22,320	\$ 44,640
TBN - Lab Technician 40h/week (Scholarship)	1	\$ 22,320	\$ 22,320	\$ 44,640
OTHER DIRECT COSTS:				
SUPPLIES				
Update of clinic license to include laboratory	1	\$ 1,000	\$ -	\$ 1,000
Laboratory Multi-sample Shaker	3	\$ 300	\$ -	\$ 300
Microscopy Dark field	1	\$ 500	\$ -	\$ 500
Dark field microscopy resources	160	\$ 50	\$ 50	\$ 100
Syphilis PCR	100	\$ 3,000	\$ 3,000	\$ 6,000
VDRL/RPR (diagnosis and monitoring)	400	\$ 100	\$ 100	\$ 200
Swab	1120	\$ 100	\$ 100	\$ 200
Blood collection kit (50 units each kit)	2	\$ 60	\$ 60	\$ 120
DNA shield kit (collection tube, reagent)	90	\$ 500	\$ 500	\$ 1,000
Tablet -access to RedCap	2	\$ 500	\$ 500	\$ 1,000
EQUIPMENT				
OTHER				
Air conditioner 12,000 BTU	2	\$ 1,900	\$ -	\$ 1,900
Cryovials	90	\$ 450	\$ 450	\$ 900
Microscope cover glass	320	\$ 10	\$ -	\$ 10
Centrifuge	1	\$ 500	\$ -	\$ 500
Patient incentive	180	\$ 5,000	\$ 5,000	\$ 10,000
IRB	1	\$ -	\$ -	\$ -
TRAVEL				
Air ticket , Per Diem and Accomodation	5	\$ 5,000	\$ -	\$ 5,000
PRINTING:				
Printing of information material and free and infor	100	\$ 3,000	\$ 3,000	\$ 6,000
Total		\$ 66,610	\$ 57,400	\$ 124,010
Indirect rate @ 15%		\$ 9,992	\$ 8,610	\$ 18,602
TOTAL BUDGET		\$ 76,602	\$ 66,010	\$ 142,612

13 Equipe da Pesquisa

Nome, títulos	Função	Instituição
Fernanda Fernandes Fonseca, MD, MSc	Pesquisadora principal	AIDS HealthCare Foundation
Arlene Seña, MD, MPH	Co-investigadora	Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill
Adele Benzaken, MD, PhD	Co-investigadora	AIDS HealthCare Foundation
Maria Luiza Bazzo, MD	Co-investigadora	Universidade Federal de Santa Catarina
François	Co-investigador	Clínica do Homem, AHF
Beto de Jesus	Co-investigador	AHF

14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seña AC, Matoga MM, Yang L, et al. Clinical and genomic diversity of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*: A global, multi-center study of early syphilis to inform vaccine research. *Lancet Microbe*. 2024 Set;5(9):100871.
2. Matoga MM, Chen JS, Ndalama B, et al. Etiologies of genital ulcer disease among sexually transmitted infections clinic patients in Lilongwe, Malawi. Apresentado no IST and HIV World Congress 2023, Chicago.
3. Organização Mundial da Saúde. Mpox – República Democrática do Congo. Junho de 2024. Acessado em <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON522>
4. Timothy JWS, Beale MA, Rogers E, Zaizay Z, Halliday KE, Mulbah T, Giddings RK, Walker SL, Thomson NR, Kollie KK, Pullan RL, Marks M. Epidemiologic and genomic reidentification of yaws, Liberia. *Emerg Infect Dis* 2021 Abr;27(4):1123-1132.
5. Kumar S, Caimano MJ, Anand A, et al. Sequence variation of rare outer membrane protein beta-barrel domains in clinical strains provides insights into the evolution of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, the syphilis spirochete. *mBio* 2018;9(3):e01006-18.
6. **MS/SVS/DATHI**. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Cuidado Integral das Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis*. Brasília : Ministério da Saúde, 2024.

15 Lista de Anexos

- 15.1 Anexo I - Lista de verificação para inclusão e procedimentos**
- 15.2 Anexo II - Formulário de elegibilidade e inclusão no estudo**
- 15.3 Anexo III - Formulário de dados demográficos e de saúde geral**
- 15.4 Anexo IV - Formulário de histórico sexual**
- 15.5 Anexo V - Formulário de histórico de IST e HIV**
- 15.6 Anexo VI - Formulário de sintomas e exame físico**
- 15.7 Anexo VII - Formulário de diagnóstico e resultados de testes no local de atendimento**
- 15.8 Anexo VIII - Formulário de coleta de amostras de pesquisa**
- 15.9 Anexo IX - Formulário de resultados de laboratório clínico**
- 15.10 Anexo X - Procedimentos para coleta de amostras de pesquisa clínica**